



**UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA**  
**Facultade Veterinaria**  
**Patoloxía Animal**

**Contribución al estudio epidemiológico de la  
brucelosis bovina en la Comunidad Autónoma de  
Galicia: investigación y aplicabilidad de las  
nuevas técnicas diagnósticas**

**Lugo**

**2011**

**ISBN 978-84-9887-615-4 (Edición digital PDF)**

<b><u>ABREVIATURAS</u></b>	<b>5</b>
<b><u>FIGURAS Y TABLAS</u></b>	<b>7</b>
<b><u>I. GENERALIDADES</u></b>	<b>11</b>
<b>A.- REVISIÓN DE LA ENFERMEDAD</b>	<b>11</b>
<b>1. HISTORIA DE LA ENFERMEDAD</b>	<b>11</b>
1.1. <i>ORIGEN DE LA ENFERMEDAD</i>	11
1.2. <i>ANTECEDENTES DE LA BRUCELOSIS EN ESPAÑA</i>	12
1.3. <i>DESARROLLO LEGISLATIVO DEL CONTROL DE LA BRUCELOSIS EN ESPAÑA</i>	13
1.4. <i>IMPLEMENTACIÓN Y DESARROLLO DE LAS CSG EN GALICIA</i>	15
1.5. <i>ASPECTOS ECONÓMICOS DE LA BRUCELOSIS ANIMAL</i>	15
<b>2. ETIOLOGÍA</b>	<b>16</b>
2.1. <i>IDENTIFICACIÓN Y DIFERENCIACIÓN DE BRUCELLA SPP.</i>	16
2.2. <i>ESTRUCTURA ANTIGÉNICA DE BRUCELLA SPP.</i>	18
2.3. <i>RESISTENCIA EN EL MEDIO AMBIENTE</i>	23
<b>3. EPIDEMIOLOGÍA</b>	<b>24</b>
3.1. <i>DISTRIBUCIÓN DE LA BRUCELOSIS ANIMAL EN EL MUNDO</i>	24
3.2. <i>EVOLUCIÓN Y SITUACIÓN ACTUAL DE LA BRUCELOSIS EN ESPAÑA</i>	27
3.3. <i>EVOLUCIÓN Y PERSPECTIVAS DE LA BRUCELOSIS BOVINA EN GALICIA</i>	30
3.4. <i>PRINCIPALES FACTORES EPIDEMIOLÓGICOS DE LA BRUCELOSIS</i>	32
3.4.1 <i>Hospedadores</i>	32
3.4.2 <i>Vías de eliminación y formas de contagio</i>	33
3.4.3 <i>Factores de riesgo</i>	34
<b>4. PATOGENIA, SÍNTOMAS Y LESIONES</b>	<b>35</b>
4.1. <i>PATOGENIA</i>	35
4.2. <i>SÍNTOMAS Y LESIONES</i>	38
<b>5. LA RESPUESTA INMUNITARIA FRENTE A BRUCELLA ABORTUS</b>	<b>40</b>
5.1. <i>INMUNIDAD DE BASE CELULAR</i>	40
5.2. <i>INMUNIDAD DE BASE HUMORAL</i>	42
5.2.1 <i>Estructura básica de las inmunoglobulinas</i>	42
5.2.2 <i>Principales tipos de inmunoglobulinas</i>	46
5.2.3 <i>La respuesta inmunitaria productora de anticuerpos</i>	47
5.2.4 <i>Tipos de respuesta y actividad de los anticuerpos frente a Brucella spp.</i>	47
<b>6. DIAGNÓSTICO</b>	<b>53</b>
6.1. <i>RELACIÓN ESTRUCTURA ANTIGÉNICA-PRUEBAS DIAGNÓSTICAS</i>	53
6.2. <i>PRUEBAS DIAGNÓSTICAS DIRECTAS</i>	56
6.2.1 <i>Tinciones</i>	56
6.2.2 <i>Cultivo, aislamiento e identificación</i>	56
6.2.3 <i>Reacción en cadena de la polimerasa</i>	57
6.3. <i>PRUEBAS DIAGNÓSTICAS INDIRECTAS</i>	57
6.3.1 <i>Aglutinación en macroplaca con rosa de Bengala</i>	59
6.3.2 <i>Prueba del anillo o ring test</i>	60
6.3.3 <i>Fijación de complemento</i>	60
6.3.4 <i>Inmunodifusión radial</i>	60
6.3.5 <i>ELISAs</i>	61
6.4. <i>PRUEBAS DIAGNÓSTICAS BASADAS EN LA INMUNIDAD CELULAR</i>	62
6.4.1 <i>Pruebas alérgicas</i>	62

<b>7. MEDIDAS DE CONTROL Y ERRADICACIÓN</b>	<b>62</b>
7.1. <i>ESTRATEGIAS DE CONTROL Y ERRADICACIÓN DE LA BRUCELOSIS</i>	62
7.2. <i>PROFILAXIS MEDIANTE EL USO DE VACUNAS</i>	64
7.3. <i>ESTRATEGIA PARA EL CONTROL DE LA BRUCELOSIS EN GALICIA</i>	65
<b>B.- REVISIÓN DE LA VALIDACIÓN Y VERIFICACIÓN DE TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS</b>	<b>68</b>
<b>8. VALIDACIÓN Y VERIFICACIÓN DE TEST DE ELISA</b>	<b>68</b>
8.1. <i>ASPECTOS GENERALES DE LA VALIDACIÓN Y VERIFICACIÓN DE UN ENSAYO</i>	68
8.2. <i>LA VALIDACIÓN DE UN ELISA SEGÚN LA OIE</i>	69
8.2.1 <i>Introducción a la validación de un ELISA</i>	69
8.2.2 <i>Fases de la validación de un ELISA</i>	72
8.2.3 <i>Tipos de muestras necesarias para la validación de un ELISA</i>	75
8.2.3.1 <i>Estándares de referencia</i>	75
8.2.3.2 <i>Muestras obtenidas de animales de referencia</i>	78
8.2.4 <i>La estimación del rendimiento de los test de diagnóstico</i>	81
8.2.4.1 <i>Sensibilidad y especificidad analítica</i>	82
8.2.4.2 <i>Sensibilidad y especificidad diagnóstica</i>	82
8.2.4.3 <i>Valor predictivo positivo y negativo</i>	84
8.2.4.4 <i>Valor global, concordancia, eficiencia o índice de validez</i>	84
8.2.4.5 <i>Razón de verosimilitud</i>	85
8.2.4.6 <i>Curvas ROC</i>	87
8.2.4.7 <i>Índice de Youden (IY)</i>	88
8.2.4.8 <i>Índice Kappa</i>	88
8.2.4.9 <i>Prevalencia real</i>	91
8.3. <i>EL ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD EN LOS LABORATORIOS DE ENSAYO.</i>	91
8.4. <i>VERIFICACIÓN INTERNA DE MÉTODOS DE ENSAYO DE ELISA</i>	95
8.4.1 <i>Generalidades sobre la verificación interna de los test de ELISA</i>	95
8.4.2 <i>Principales parámetros utilizados en la verificación de métodos de ensayo</i>	97
8.4.3 <i>Estándares y muestras para la verificación interna de los test de ELISA</i>	98
8.4.4 <i>Procedimiento de verificación interna de los test de ELISA</i>	99
8.4.5 <i>Control interno de calidad para los test de ELISA</i>	103
8.4.5.1 <i>Muestras para control interno de calidad en los test de ELISA</i>	103
8.4.5.2 <i>Gráficos de control para test de ELISA</i>	104
8.5. <i>MEJORA Y EXTENSIÓN DE LOS PROCESOS DE VALIDACIÓN</i>	108
<b>II. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</b>	<b>109</b>
<b>III. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>112</b>
<b>1. ESTÁNDARES Y MUESTRAS PARA VERIFICACIÓN Y CONTROL INTERNO</b>	<b>112</b>
<b>2. ESPECIFICACIONES TÉCNICAS DE LOS ELISAS UTILIZADOS</b>	<b>115</b>
2.1. <i>FUNDAMENTO DE LOS TEST DE ELISA</i>	115
2.1.1. <i>ELISA indirecto</i>	115
2.1.2. <i>ELISA competición</i>	115
2.2. <i>PROCEDIMIENTO DE ENSAYO DE LOS TEST DE ELISA</i>	115
2.2.1. <i>Expresión e interpretación de resultados en el ELISAi Svanova</i>	116
2.2.2. <i>Expresión e interpretación de resultados en el ELISAi Idexx</i>	117
2.2.3. <i>Expresión e interpretación de resultados en el ELISAc Svanova</i>	118
<b>3. OTROS TEST UTILIZADOS EN EL ESTUDIO</b>	<b>120</b>
3.1. <i>AGLUTINACIÓN EN MICROPLACA CON ROSA DE BENGALA (AMRB)</i>	120
3.1.1. <i>Protocolo para la realización del test</i>	120
3.1.2. <i>Expresión e interpretación de resultados</i>	120
3.2. <i>FUACIÓN DE COMPLEMENTO (FC)</i>	121

3.3.	<i> AISLAMIENTO EN MEDIOS SELECTIVOS</i>	124
<b>4.</b>	<b>VERIFICACIÓN INTERNA DE LA AMRB</b>	<b>126</b>
4.1.	<i> ESTIMACIÓN DE LA EXACTITUD Y DE LA PRECISIÓN</i>	126
4.2.	<i> PARTICIPACIÓN EN ENSAYOS INTERLABORATORIO</i>	127
<b>5.</b>	<b>VERIFICACIÓN INTERNA DE LOS TEST DE ELISA</b>	<b>127</b>
5.1.	<i> ESTIMACIÓN DE LA EXACTITUD Y DE LA PRECISIÓN EN CONDICIONES DE REPETIBILIDAD</i>	127
5.2.	<i> ESTIMACIÓN DE LA PRECISIÓN EN CONDICIONES DE REPETIBILIDAD INTERMEDIA</i>	130
<b>6.</b>	<b>EXTENSIÓN DE LA VALIDACIÓN DE LOS TEST DE ELISA</b>	<b>132</b>
6.1.	<i> OBTENCIÓN DE SUEROS PARA LA EXTENSIÓN DE LA VALIDACIÓN</i>	133
6.2.	<i> TAMAÑO DE LA MUESTRA PARA LA ESTIMACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE RENDIMIENTO</i>	134
6.3.	<i> DEFINICIÓN DE LOS GRUPOS DE MUESTRAS UTILIZADOS EN LA EXTENSIÓN DE LA VALIDACIÓN</i>	134
<b>7.</b>	<b>TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS</b>	<b>139</b>
<b><u>I V. RESULTADOS</u></b>		<b>140</b>
<b>1.</b>	<b>VERIFICACIÓN INTERNA DE LA AMRB</b>	<b>140</b>
1.1.	<i> ESTIMACIÓN DE LA EXACTITUD</i>	140
1.2.	<i> RESULTADOS DE ENSAYOS INTERLABORATORIO</i>	141
<b>2.</b>	<b>VERIFICACIÓN INTERNA Y CONTROL INTERNO DE CALIDAD PARA TEST DE ELISA</b>	<b>142</b>
2.1.	<i> ESTIMACIÓN DE LA EXACTITUD Y DE LA PRECISIÓN EN CONDICIONES DE REPETIBILIDAD</i>	142
2.2.	<i> ESTIMACIÓN DE LA PRECISIÓN EN CONDICIONES DE REPETIBILIDAD INTERMEDIA Y ELABORACIÓN DE GRÁFICOS DE CONTROL</i>	153
<b>3.</b>	<b>EXTENSIÓN DE LA VALIDACIÓN PARA LOS TEST DE ELISA</b>	<b>161</b>
3.1.	<i> ESTIMACIÓN DEL TAMAÑO DE MUESTRA NECESARIO PARA LA EXTENSIÓN DE LA VALIDACIÓN</i>	161
3.2.	<i> COMPARACIÓN CON OTROS MÉTODOS DE ENSAYO</i>	163
3.2.1.	<i> Criterio de comparación absoluto</i>	163
3.2.1.1.	<i> Parámetros básicos de rendimiento</i>	163
3.2.1.2.	<i> Curvas ROC</i>	165
3.2.1.3.	<i> Índice Kappa</i>	166
3.2.2.	<i> Criterio de comparación relativo</i>	167
3.2.2.1.	<i> Parámetros básicos de rendimiento</i>	167
3.2.2.2.	<i> Curvas ROC</i>	169
3.2.2.3.	<i> Índice Kappa</i>	170
3.3.	<i> RESULTADOS POR GRUPOS DE MUESTRAS EN DIFERENTES SITUACIONES EPIDEMIOLÓGICAS</i>	171
3.3.1.	<i> Sueros positivos de animales con aislamiento (grupo A)</i>	171
3.3.2.	<i> Sueros de animales con conversión del título (grupo B)</i>	172
3.3.3.	<i> Sueros positivos de animales sin aislamiento (grupo C)</i>	174
3.3.4.	<i> Sueros negativos de animales oficialmente indemnes (grupo D)</i>	175
3.3.5.	<i> Sueros negativos acompañantes de infectados (grupo E)</i>	175
3.3.6.	<i> Sueros con poder anticomplementario (grupo F)</i>	176
3.3.7.	<i> Sueros falsos positivos (grupo G)</i>	177
3.4.	<i> DISTRIBUCIÓN DE LOS SUEROS EN EL RANGO DE DETECCIÓN DE LOS ELISAS</i>	179
<b><u>V. DISCUSIÓN</u></b>		<b>188</b>
1.	<i> LA VERIFICACIÓN INTERNA DE LA AMRB Y DE LOS ELISAS</i>	188
2.	<i> ANÁLISIS DE LOS GRUPOS DE SUEROS UTILIZADOS EN LA EXTENSIÓN DE LA VALIDACIÓN</i>	194
3.	<i> ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LA EXTENSIÓN DE LA VALIDACIÓN CON LA AMRB Y LOS ELISAS APLICANDO EL CRITERIO DE COMPARACIÓN ABSOLUTO</i>	198

4.	<i>ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN LA EXTENSIÓN DE LA VALIDACIÓN CON LOS ELISAs UTILIZANDO EL CRITERIO DE COMPARACIÓN RELATIVO Y RECOMENDACIONES DE USO DE ESOS TEST EN DIFERENTES SITUACIONES EPIDEMIOLÓGICAS EN RELACIÓN A LA BRUCELOSIS BOVINA</i>	201
<b><u>VI. CONCLUSIONES</u></b>		<b>208</b>
	<i>RELACIONADAS CON LA VERIFICACIÓN INTERNA DE LOS TEST</i>	208
	<i>RELACIONADAS CON LOS PARÁMETROS DE RENDIMIENTO ABSOLUTO</i>	208
	<i>RELACIONADAS CON LAS RECOMENDACIONES DE USO EN DETERMINADAS SITUACIONES EPIDEMIOLÓGICAS</i>	209
<b><u>VII. RESUMEN</u></b>		<b>210</b>
<b><u>VIII. SUMMARY</u></b>		<b>212</b>
<b><u>IX. BIBLIOGRAFÍA</u></b>		<b>214</b>
<b><u>X. LEGISLACIÓN</u></b>		<b>228</b>

# **ABREVIATURAS**

Ac	Anticuerpo, anticuerpos
Ag	Antígeno, antígenos
AMRB	Aglutinación en microplaca con rosa de Bengala
AUC	Area under curve
C+	Control positivo débil
C++	Control positivo fuerte
CA	Comunidad Autónoma
Cc	Control de conjugado
CCAA	Comunidades Autónomas
CN	Control negativo
COff	Punto de corte
CSG	Campañas de saneamiento ganadero
CV	Coeficiente de variación
DDD	Daily Detailed Data charts
DGRAG	Dirección General de Recursos Agrícolas y Ganaderos
DO	Densidad óptica
EC	Equipos de campo
ELISAc	Elisa competición
ELISAi	Elisa indirecto
ENAC	Entidad Nacional de Acreditación
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación
FC	Fijación de complemento
FN	Falso negativo
FP	Falso positive
IAEA	International Atomic Energy Agency
IFN- $\gamma$	Gamma interferon
Ig	Inmunoglobulinas
IQC	Internal Quality Control
IY	Índice de Youden
LASAPAGA	Laboratorio de Sanidade e Producción Animal de Galicia
LNR-B	Laboratorio Nacional de Referencia para la brucelosis
LPS	Lipopolisacárido
LPS-R	Lipopolisacárido rugoso
LPS-S	Lipopolisacárido liso
<i>M</i>	Media de la muestra
Mab	Anticuerpo monoclonal
MARM	Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MPDOIE	Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres
NK	Células de citotoxicidad natural
NH	Hapteno nativo
OIE	Organización Mundial de Sanidad Animal
OIEELISpSS	Suero estándar fuertemente positivo de la OIE para ELISA
OIEISS	Suero estándar de referencia internacional de la OIE (antes denominado Segundo suero anti- <i>B. abortus</i> de la Organización Mundial de la Salud)
OMPs	Outer membrane proteins

PA	Poder anticomplementario
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PE	Proporción de resultados iguales debido al azar
PMN	Polimorfonucleares neutrófilos
PI	Porcentaje de inhibición expresado en tantos por ciento
PNE	Programas Nacionales de Erradicación
PP	Porcentaje de positividad expresado en tantos por ciento
PSRN-Neg	Patrón secundario de referencia nacional negativo a brucelosis
PSRN-Pos	Patrón secundario de referencia nacional positivo a brucelosis
RB	Aglutinación en macroplaca con rosa de Bengala
RER	Retículo endoplásmico rugoso
RI	Índice de rendimiento
ROC	Receiver Operating Characteristic Curve
RV	Razón de Verosimilitud
RedBNM	Red Nacional de Bancos de Muestras de Sanidad Animal
SC	Servicios Centrales
SD	Desviación estándar de la media, desviaciones estándar de la media
SDC	Summary Data Charts
Se	Sensibilidad
SOD	Superóxido dismutasa
Sp	Especificidad
SSVVOO	Servicios Veterinarios Oficiales
SVP	Servicios Veterinarios Provinciales
T CD4+	Linfocitos T cooperadores
T CD8+	Linfocitos T citotóxicos
TNF	Factor de necrosis tumoral
UE	Unión Europea
VC	Veterinario Coordinador
VN	Verdadero negativo
VP	Verdadero positivo
VPN	Valor predictivo negativo
VPP	Valor predictivo positivo

# Figuras y tablas

## FIGURAS

Figura 1. Estructura (principales componentes y distribución) de la envoltura externa de una <i>Brucella</i> spp. lisa (Moreno y cols., 1998)	19
Figura 2. Diferencias estructurales entre una cepa lisa y una rugosa de <i>Brucella</i> spp. (Moriyón, 1986)	20
Figura 3. Representación de la más probable distribución de epítomos a nivel de la cadena O y del lípido A del LPS de <i>B. abortus</i> biotipo 1 (Rojas y cols., 1994)	21
Figura 4. Modelo esquemático de la distribución de epítomos en los LPS-S y NH de los biotipos 1 de <i>B. abortus</i> y de <i>B. mellitensis</i> (Moriyón y López-Goñi, 2002).	22
Figura 5. Prevalencia de rebaño e incidencia en animales en el período 1986-2007 de brucelosis bovina en España (MARM, 2008)	28
Figura 6. Mapa de prevalencias por rebaño de brucelosis bovina en España en el año 2007 (MARM, 2008)	29
Figura 7. Modelo de tránsito de <i>Brucella abortus</i> en células HeLa (Pizarro-Cerdá y cols., 2000)	37
Figura 8. Imágenes de lesiones típicas de <i>Brucella</i> spp. (Bovis, 1986)	39
Figura 9. Modelo de defensa frente a brucelosis en bovino (Wyckoff, 2002)	42
Figura 10. Esquemas de la estructura responsable de la actividad funcional y de las propiedades biológicas de las inmunoglobulinas	44
Figura 11. Estructura y funciones de las inmunoglobulinas	45
Figura 12. Modelo propuesto de respuesta primaria y secundaria	48
Figura 13. Fenómeno de prozona en reacciones secundarias	52
Figura 14. Disposición espacial del LPS-S según su uso en pruebas diagnósticas (Moriyón y López-Goñi, 2002)	55
Figura 15. Tipos de curvas ROC	87
Figura 16. Variación de la Se y la Sp según el COff	88
Figura 17. Esquema general de aplicación de la UNE-EN ISO/IEC 17025 en un laboratorio (Elaboración propia)	94
Figura 18. Representación gráfica de la exactitud de un método de ensayo	98
Figura 19. Estructura básica de un gráfico de control	104
Figura 20. Distribución de controles en placas de ELISA (Crowther, 2009)	106
Figura 21. Imagen de un gráfico DDD con valores de 8 placas de ELISA diferentes para el C++	107
Figura 22. Resultados a Aglutinación en microplaca con RB	121
Figura 23. Microplaca con una FC	124
Figura 24. Crecimiento de <i>Brucella</i> spp. en el medio selectivo de Thayer- Martin	125
Figura 25. Crecimiento de <i>Brucella</i> spp. en el medio selectivo de Farrel	125
Figura 26. Muestra de suero recibida en el laboratorio	133
Figura 27. Distribución de frecuencias de los sueros positivos de animales con aislamiento según título a FC (grupo A)	137
Figura 28. Distribución de frecuencias de la segunda extracción de los sueros con conversión según título a FC (grupo B)	137
Figura 29. Distribución de frecuencia de los sueros positivos de animales sin aislamiento según título a FC (grupo C)	138
Figura 30. Frecuencia de los sueros falsos positivos según título a FC (grupo G)	138
Figura 31. Representación de los valores del PP y de PI para los ELISAI y ELISAc del PSNR-Pos y del suero Abadín.	144
Figura 32. Gráfico de los PP de cada dilución del suero Abadín. ELISAI Svanova	147
Figura 33. Gráfico del CV de cada dilución del suero Abadín. ELISAI Svanova	147
Figura 34. Gráfico de los PP de cada dilución del suero Abadín con el ELISAI Idexx.	148
Figura 35. Gráfico del CV de cada dilución del suero Abadín. ELISAI Idexxdexx	148
Figura 36. Gráfico de los PI de cada dilución del suero Abadín. ELISAc Svanova	148
Figura 37. Gráfico del CV de cada dilución del suero Abadín. ELISAc Svanova	149
Figura 38. Gráfico de los PP medios de cada dilución de los sueros A, B y C. ELISAI Svanova	150
Figura 39. Gráfico del CV medio de cada dilución de los sueros A, B y C. ELISAI Svanova	150



Figura 40. Gráfico de los PP medios de cada dilución de los sueros A, B y C. ELISAI Idexx	151
Figura 41. Gráfico del CV medio de cada dilución de los sueros A, B y C. ELISAI Idexx	151
Figura 42. Gráfico de los PI medios de cada dilución de los sueros A, B y C. ELISAc Svanova	152
Figura 43. Gráfico del CV medio de cada dilución de los sueros A, B y C. ELISAc Svanova	152
Figura 44. Gráfico DDD de la DO del control positivo para la estimación de la precisión en condiciones de repetibilidad intermedia. ELISAI Svanova	155
Figura 45. Gráfico DDD del PP del suero Abadín para la estimación de la precisión en condiciones de repetibilidad intermedia. ELISAI Svanova	155
Figura 46. Gráfico DDD de la DO del control positivo para la estimación de la precisión en condiciones de repetibilidad intermedia. ELISAI Idexx	156
Figura 47. Gráfico DDD del PP del suero Abadín para la estimación de la precisión en condiciones de repetibilidad intermedia. ELISAI Idexx	156
Figura 48. Gráfico DDD de la DO del control negativo para la estimación de la precisión en condiciones de repetibilidad intermedia. ELISAc Svanova	157
Figura 49. Gráfico DDD del PI del suero Abadín para la estimación de la precisión en condiciones de repetibilidad intermedia. ELISAc Svanova	157
Figura 50. Gráfico SDC de la DO del control positivo del test y del suero Abadín en el ELISAI de Svanova	157
Figura 51. Gráfico SDC del PP del suero Abadín en relación al control positivo del test en el ELISAI Svanova	158
Figura 52. Gráfico SDC de la DO del control positivo del test y del suero Abadín en el ELISAI Idexx	159
Figura 53. Gráfico	159
Figura 54. Gráfico SDC de la DO del control negativo del test y del suero Abadín en el ELISAc Svanova	160
Figura 55. Gráfico SDC del PI del suero Abadín en relación al control del conjugado del test en el ELISAc Svanova	160
Figura 56. Curvas ROC de los tres ELISAs aplicando el criterio de comparación absoluto	165
Figura 57. Curvas ROC de los tres ELISAs aplicando el criterio de comparación relativo	169
Figura 58. Gráficos de dispersión de los resultados de animales con aislamiento positivo (grupo A)	171
Figura 59. Gráficos de dispersión de los resultados de animales con conversión del título (grupo B)	173
Figura 60. Gráficos de dispersión de los resultados de animales positivos sin aislamiento (grupo C)	174
Figura 61. Gráficos de dispersión de los resultados de animales negativos acompañantes de infectados (grupo E)	176
Figura 62. Gráficos de dispersión de los resultados de sueros con poder anticomplementario (grupo F)	177
Figura 63. Gráficos de dispersión de los resultados de sueros clasificados como falsos positivos	178
Figura 64. Rango de distribución de sueros positivos según el valor del PP para el ELISAI Svanova	181
Figura 65. Rango de distribución de sueros positivos según el valor del PP para el ELISAI Idexx	181
Figura 66. Rango de distribución de sueros positivos según el valor del PI para el ELISAc Svanova	182
Figura 67. Rango de distribución de sueros negativos según el valor del PP para el ELISAI Svanova	182
Figura 68. Rango de distribución de sueros negativos según el valor del PP para el ELISAI Idexx	183
Figura 69. Rango de distribución de sueros negativos según el valor del PI para el ELISAc Svanova	183
Figura 70. Rango de distribución de sueros falsos positivos según el valor del PP para el ELISAI Svanova	184
Figura 71. Rango de distribución de sueros falsos positivos según el valor del PP para el ELISAI Idexx	184
Figura 72. Rango de distribución de sueros falsos positivos según el valor del PI para el ELISAc Svanova	185
Figura 73. Curvas ROC del ELISAI Svanova para tres COff diferentes en relación a AMRB+FC	185
Figura 74. Curvas ROC del ELISAI Idexx para tres COff diferentes en relación a AMRB+FC	186
Figura 75. Curvas ROC del ELISAc Svanova para tres COff diferentes en relación a AMRB+FC	186

## TABLAS

Tabla 1. Características diferenciales de especies del género <i>Brucella</i> (OIE, 2004)	17
Tabla 2. Prueba de diferenciación de biovars de <i>Brucella</i> spp. (Marín y cols., 2002)	18
Tabla 3. Tiempos de supervivencia de <i>Brucella</i> spp. en determinadas condiciones ambientales. Modificado de Barberán y Blasco, 2002	23
Tabla 4. Evolución de la prevalencia de brucelosis bovina por establos en España en el período 2001-2008 (MARM, 2009)	28
Tabla 5. Evolución de la brucelosis bovina en Galicia (Fuente: Xunta de Galicia)	31
Tabla 6. Principales Isotipos de inmunoglobulinas presentes en algunas especies animales. (Tizard, 2009)	46
Tabla 7. Propiedades más importantes de las principales clases de inmunoglobulinas implicadas en la inmunidad de tipo humoral en ganado vacuno	50
Tabla 8. Principales Ag brucelares utilizados en el diagnóstico indirecto. Modificada de Moriyón y López-Goñi, 2002.	54
Tabla 9. Clasificación de las pruebas serológicas según el isotipo de inmunoglobulina que interviene en la reacción (Díaz y Blasco, 1994)	58
Tabla 10. Esquema de actuación de los Servicios Veterinarios Oficiales (SSVVOO) en las CSG	67
Tabla 11. Estimación de la precisión preliminar en la validación de un método en condiciones de repetibilidad y de repetibilidad intermedia (Propuesto por Jacobson, 1998)	74
Tabla 12. Número de muestras de animales de referencia teóricamente necesario para validar un ensayo. (extractato de Jacobson, 1998)	79
Tabla 13. Comparación de “gold standard” y test.	81
Tabla 14. Guía aproximada para interpretación de la RV. (Hospital Ramón y Cajal, 2009)	86
Tabla 15. Interpretación del grado de acuerdo en función del valor del índice <i>Kappa</i> según Landis y Koch (Hospital Ramón y Cajal, 2009)	90
Tabla 16. Definiciones de términos básicos de la Calidad. ISO 8402 y otras.	93
Tabla 17. Contenido básico de la UNE-EN ISO/IEC 17025	94
Tabla 18. Principales parámetros de calidad para métodos cualitativos y cuantitativos (Ruisánchez y cols., 2003)	96
Tabla 19. Requerimientos mínimos para verificación y validación de test o sistemas de test en virología clínica (Rabenau y cols., 2007)	100
Tabla 20. Verificación de un test de Ac, número de muestras requeridas y resultado por parámetro modificada de Rabenau y cols., 2007	101
Tabla 21. Porcentajes recomendables de falsos positivos y de falsos negativos en la verificación interna de un test de ELISA utilizando tablas de 2x2 (Gabinete de Servicios para la Calidad, 2009)	102
Tabla 22. Significado y contenido de los gráficos DDD y SDC del modelo de gráficos de control (Crowther, 2009)	105
Tabla 23. Relación de sueros utilizados en la verificación de los test de AMRB y de los ELISAs	114
Tabla 24. Número y dilución de uso de los sueros utilizados en condiciones de repetibilidad para la AMRB y los ELISAs	114
Tabla 25. Interpretación del PP en el ELISAi Svanova	116
Tabla 26. Interpretación del PP en el ELISAi Idexx	117
Tabla 27. Interpretación del PI en el ELISAc Svanova	118
Tabla 28. Procedimiento abreviado de los test de ELISA	119
Tabla 29. Expresión y significado del resultado de los ensayos con la AMRB	121
Tabla 30. Requisitos para la validación de un ensayo de FC	122
Tabla 31. Cuantificación del resultado positivo a la prueba de FC	123
Tabla 32. Unidades UIFC para FC	123
Tabla 33. Pruebas para identificación de bacterias de <i>Brucella</i> spp.	125
Tabla 34. Número de resultados posibles para las diluciones de uso de cada patrón en la AMRB	126
Tabla 35. Número de resultados posibles para las diluciones de uso de cada patrón y para cada test	128
Tabla 36. Verificación interna de los ELISAs y de la AMRB según las condiciones de realización de los ensayos	131
Tabla 37. Sueros de referencia para estimación de los parámetros de rendimiento de los ELISAs	136

Tabla 38. Resultados obtenidos en tres días para la verificación interna de AMRB, RB y AMRB de doble suero	141
Tabla 39. Datos de participación en ensayos interlaboratorios para AMRB, RB y AMRB de doble suero	141
Tabla 40. Resultados obtenidos en los ensayos interlaboratorio para la AMRB, la RB y la AMRB de doble suero	142
Tabla 41. Valores medios de PP y del PI de estándares y muestras utilizadas para elaborar los gráficos de control	143
Tabla 42.- Nº de muestras usadas y valores estimados de Se y la Sp en diferentes estudios	161
Tabla 43. Valores de los parámetros de rendimiento de los ELISAs aplicando el criterio de comparación absoluto	163
Tabla 44. Obtención del índice <i>Kappa</i> para los diferentes test aplicando el criterio de comparación absoluto	166
Tabla 45. Valor del índice <i>Kappa</i> de los test en relación al método de referencia	166
Tabla 46. Valores de los parámetros de rendimiento de los ELISAs aplicando el criterio de comparación relativo	167
Tabla 47. Obtención del índice <i>Kappa</i> para los diferentes test aplicando el criterio de comparación relativo	170
Tabla 48. Resumen de los valores del AUC y del índice <i>Kappa</i> para los ELISAs en las situaciones estudiadas	170
Tabla 49. Resultados obtenidos por los diferentes test con el grupo de sueros positivos con aislamiento	171
Tabla 50. Resultados de los test con sueros de la primera extracción de animales con conversión de Ac	172
Tabla 51. Resultados de los test con sueros de la segunda extracción de animales con conversión de Ac	173
Tabla 52. Resultados de todos los test con los sueros de animales positivos sin aislamiento (grupo C)	174
Tabla 53. Resultados obtenidos por los diferentes test con el grupo de sueros negativos (grupo D)	175
Tabla 54. Resultados obtenidos con los sueros de animales negativos acompañantes de infectados (grupo E)	175
Tabla 55. Resultados obtenidos por los diferentes test con el grupo de sueros con poder anticomplementario	177
Tabla 56. Resultados de los test con los sueros clasificados como falsos positivos	178
Tabla 57. Curvas ROC obtenidas para los tres ELISAs para cinco COff diferentes	187
Tabla 58. Se y Sp relativa combinada obtenida por Gall y cols. (1998)	202

# **I. Generalidades**

## **A.- Revisión de la enfermedad**

La brucelosis es una zoonosis originada por una bacteria Gram negativa perteneciente al género *Brucella* spp. que puede afectar a una gran variedad de animales, tanto salvajes como domésticos, que constituyen la principal fuente de infección para el hombre mediante el consumo de alimentos infectados o a través de la convivencia o de la relación profesional con animales infectados. El hombre suele ser hospedador final de la enfermedad.

Tanto la brucelosis humana como la animal están ampliamente distribuidas por el mundo. Existen zonas endémicas como son los países mediterráneos, los de Oriente Próximo, Latinoamérica y algunas regiones de Asia, aunque se desconoce la verdadera incidencia de esta enfermedad (European Communities, 2001)

Se han establecido programas de control y erradicación de la enfermedad en la mayor parte del mundo, existiendo grandes áreas libres en la actualidad.

La brucelosis está incluida en la Lista de enfermedades de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) en los siguientes epígrafes (OIE, 2006b):

- Enfermedades comunes a varias especies, brucelosis: *Brucella abortus* (*B. abortus*), *Brucella mellitensis* (*B. mellitensis*), *Brucella suis* (*B. suis*)
- Enfermedades ovinas y caprinas, epididimitis ovina: *Brucella ovis* (*B. ovis*)

Adicionalmente, en la normativa española, también están incluidas en el apartado B del Anexo 1 de la Orden ARM/831/2009, que modifica el Real Decreto 617/2007 sobre enfermedades de declaración obligatoria. Aunque las enfermedades de declaración obligatoria en la Unión Europea (UE) se incluyen en el apartado A, las incluidas en el apartado B están sometidas a la obligación de comunicación a la UE y a la OIE en los mismos términos que las incluidas en el apartado A.

## **1. Historia de la enfermedad**

### ***1.1. Origen de la enfermedad***

El agente responsable de la brucelosis se aisló por primera vez en Malta por David Bruce, en 1887, a partir de bazos de soldados británicos muertos por esta enfermedad. El agente se denominó *Micrococcus mellitensis* (Nicoletti, 2002).

Aunque el aborto epidémico del ganado vacuno era conocido con anterioridad en el estado de Louisiana (USA), la bacteria causante no fue aislada hasta 1895 por el veterinario danés

Bernhard Bang, en Copenhague, a partir de abortos de ganado vacuno y se denominó *Bacillus abortus* (Orduña y cols., 2001a).

En 1897, Wright y Smith describieron las aglutinaciones específicas en sueros sanguíneos de enfermos (Orduña y cols., 2001a; Rodríguez y cols., 2005).

Posteriormente, en 1905, el médico maltés Themistocles Zammit determinó la importancia que tenían las cabras en la transmisión de la enfermedad debido al consumo de productos lácteos sin pasteurizar (Blasco y Gamazo, 1994).

En 1914 se aisló *B. suis* en Estados Unidos como causante del aborto enzoótico en el ganado porcino por Jacob Traum que inicialmente la identificó como *Brucella abortus* (Orduña y cols., 2001a; Nielsen, 2002).

Alice Evans, en 1918, comprobó la relación que existía entre el agente de D. Bruce y el de B. Bang y en 1920, Meyer y Shaw sugirieron incluir a estas bacterias dentro del nombre genérico de *Brucella* (Orduña y cols., 2001a ; Rodríguez y cols., 2005).

*Brucella ovis* fue aislada por primera vez en Nueva Zelanda por McFarlane, en 1952, a partir de ovejas abortadas (Nielsen, 2002). En 1953, Simmons y Hall en Australia y Buddle y Boyes en Nueva Zelanda, informaron de *B. ovis* como responsable de la epididimitis del carnero (Díaz y cols., 1967; Robles, 1998).

En 1956, Stoenner y Lackman describieron un agente aislado en la rata de la madera del desierto que por sus características de crecimiento en medios de cultivo permitían clasificarlo como una nueva especie del género *Brucella* y propusieron el nombre de *Brucella neotomae* (Cameron y Meyer, 1958).

En 1966, Kimberling informó de tres casos de aborto en perros por *Brucella canis* (Nielsen, 2002). En el mismo año, Carmichael y Bruner describieron el aborto de 200 beagles por *B. canis* en Estados Unidos (Díaz y cols., 1968).

En 1994 se informó por primera vez de la detección de microorganismos del género *Brucella* en el mamífero marino *Tursiops truncatus* (Ewalt y cols., 1994). También Ross y cols. en 1994 proponen como un nuevo género de *Brucella* los aislados en mamíferos marinos en las costas de Escocia. En 1997 se propuso como nombre para la nueva especie el de *B. maris* (Jahans y cols., 1997). Por último, Clockaer y cols. en 2001 clasificaron los aislados de mamíferos marinos mediante análisis de polimorfismo de DNA del locus omp2 como *B. cetaceae* y *B. pinnipediae*. En todos estos años se han aislado microorganismos del género *Brucella* en una gran cantidad de mamíferos marinos: focas, marsopas, delfines morsas y nutrias (Higgins, 2000).

## **1.2. Antecedentes de la brucelosis en España**

Para diferentes autores la llegada de la brucelosis a nuestro país fue debida a la importación de cabras afectadas procedentes de Malta y descargadas en Gibraltar (Saiz, 1978). Estas cabras constituían la principal fuente de alimentación de las tropas coloniales inglesas y estaba prohibida su venta, pero cuando se descubrió el papel que jugaban en la transmisión de la fiebre de Malta se permitió su comercio a otras zonas, constituyendo una de las principales vías

de difusión de la enfermedad por los países mediterráneos. Sin embargo, la primera referencia científica de la brucelosis en España corresponde a P. Ramón y Cajal en 1904 con el trabajo titulado “Las fiebres ondulantes mediterráneas en Aragón”, por lo que posiblemente la enfermedad ya estaba presente antes de la importación de cabras maltesas. Posteriormente, en 1905, García Izcara publica un trabajo titulado “Aborto epizootico de las ovejas”, en clara concordancia con el trabajo de Ramón y Cajal, que constituye la primera cita mundial de la infección natural de brucelosis en la oveja (Fernández y cols., 1978). Desde esta fecha y hasta 1942, en que la enfermedad pasa a ser de declaración obligatoria, se siguieron realizando importantes estudios epidemiológicos por todo el país que ponían de manifiesto la importancia que estaba adquiriendo la enfermedad tanto en los animales como en las personas, pero que de forma incomprensible no tuvieron el eco suficiente en los responsables de la Administración, por lo que en esos años las medidas adoptadas para su control fueron prácticamente nulas. Entre estos estudios destacan los siguientes: Albaladejo en la provincia de Granada en 1930, Saíz en Ciudad Real en 1930-34, Varó y Paria en Logroño en 1933 y Viñes en Alicante y Soria en 1941.

### **1.3. Desarrollo legislativo del control de la brucelosis en España**

Los principales hitos en el control de la brucelosis en España hasta finales de los años 70 están recogidos por Flores en 1978. La primera ley para el control de las epizootias en España se publicó en 1914 y no contenía la fiebre de Malta entre las enfermedades objeto de control. Posteriormente, en una Real Orden de 1917, se la incluye por primera vez entre las enfermedades epizooticas sujetas a medidas sanitarias. Desde ese momento, las diferentes disposiciones legales relacionadas con el control de enfermedades epizooticas siempre incluyeron a la fiebre de Malta. También en el año 1917, por medio de un decreto del mes de agosto, se establece la posibilidad del sacrificio obligatorio de animales afectados de enfermedades con derecho a indemnización. En la relación de enfermedades a las que se les puede aplicar esta normativa se incluye a la brucelosis. En la misma normativa también se incluyen los pasos a seguir en el caso de la aparición de la enfermedad en el hombre.

En 1929 se aprueba otra Ley de Epizootias y el reglamento correspondiente. El reglamento se modifica en 1933 y se incluye por primera vez la denominación de brucelosis para el aborto contagioso de la vaca y de la cerda con el nombre de Brucelosis A y prohíbe, también por primera vez, la venta de leche de granjas afectadas. Al resto de procesos relacionados con la Fiebre Ondulante los denomina como Brucelosis B, recogiendo las mismas disposiciones legales que el reglamento de 1929.

En 1952 se aprueba una nueva Ley de Epizootias en la que se incluye a la brucelosis como enfermedad de declaración obligatoria y se establece la necesidad de realizar campañas de saneamiento para su control, además de la adopción de medidas específicas que impidan su transmisión a las personas. El Reglamento que desarrolla la ley es de 1954 y en él se establece que se desarrollarán campañas de saneamiento estatales para la lucha contra la brucelosis caprina. Como consecuencia, ese mismo año, se realiza la primera campaña de lucha contra la

brucelosis en esta especie en la provincia de Sevilla que consistiría en investigación de anticuerpos (Ac) a partir de muestras de sangre por aglutinación y sacrificio de positivos con indemnización a los ganaderos. En 1965 se reinician las campañas de saneamiento (se habían interrumpido en 1960) con normas similares a las anteriores, pero con la novedad de la vacunación de los bovinos. Además se extiende la campaña obligatoria en cabras a otras provincias (Castellón, Valencia, Alicante, Almería, Murcia, Granada, Málaga, Cádiz y Huelva, además de Sevilla). A partir de 1967 se incluyen medidas para el control de la brucelosis humana, estudios epidemiológicos de la enfermedad, tipificación de las brucelas y se recomienda la vacunación de las hembras ovinas. Estas medidas se seguirán ampliando y aplicando hasta 1978. En este año se reinicia un Programa Nacional de Brucelosis (Flores, 1978). Este programa contempla la vacunación de las hembras bovinas jóvenes con B19 y las hembras jóvenes de ovino y caprino con Rev -1. También establece medidas de policía sanitaria como la declaración de los abortos y la calificación sanitaria de las explotaciones. Se mantiene el sacrificio de los reaccionantes positivos. En una primera fase del programa se pretendía proteger toda la población de rumiantes mediante la vacunación y en una segunda fase se prohibirían las vacunaciones y se realizaría el diagnóstico sistemático de los animales para garantizar su situación sanitaria.

Este programa se inicia en 1979 sobre ganado vacuno de leche estableciéndose tres fases de actuación (Blasco, 1986). La primera fase se extiende desde 1979 a 1985 con la vacunación de las hembras de reposición con B19, sacrificio de reaccionantes e indemnización por sacrificio. En la segunda fase (desde 1986 a 1990) se tendría erradicada la enfermedad en el ganado vacuno de leche y se iniciaría el saneamiento en el resto del ganado vacuno. En la tercera fase, desde 1991 hasta 1995, se erradicaría la enfermedad en el ganado vacuno y se establecerían controles para garantizar el nivel sanitario de las explotaciones.

Con la entrada de España en la UE se transpone al ordenamiento jurídico español una serie de normativas comunitarias básicas de los últimos 25 años para el desarrollo de los programas de erradicación de enfermedades. En 1986, por medio de una orden del 28 de febrero, la normativa española se adaptó a la directiva 64/432/CEE relativa a los problemas de policía sanitaria en materia de intercambios intracomunitarios de animales de las especies ovina y caprina. Posteriormente se adaptaron las directivas 77/391/CEE y a la 78/52/CEE relativas a los planes de lucha y control contra tuberculosis, brucelosis y leucosis enzoótica bovina (Blasco, 1994; Díaz y cols., 1997). Finalmente, el Programa Nacional de Control y Erradicación en España que se viene desarrollando desde hace más de diez años está regulado por las siguientes disposiciones básicas: RD 2611/1996, de 20 de diciembre, por el que se regulan los Programas Nacionales de Erradicación (PNE) de enfermedades de los animales y sus modificaciones (RD 3478/2000; RD 480/2002; RD 1047/2003; RD 1296/2003; RD 51/2004; RD 1616/2005; RD 908/2008) y otras como el RD 1716/2000, sobre normas sanitarias para el intercambio intracomunitario de animales de las especies bovina y porcina y el RD 1473/2005, sobre baremos de indemnización por sacrificio.

## **1.4. Implementación y desarrollo de las CSG en Galicia**

En el año 1982 se realiza la transferencia de competencias en materia de sanidad animal a la Comunidad Autónoma de Galicia por medio del RD 3318/82. En este RD se establece que le corresponde a la Comunidad Autónoma (CA) la organización, dirección, ejecución y evaluación en su ámbito territorial de las Campañas de saneamiento ganadero (CSG), reservándose el Estado la legislación básica, la planificación general y la coordinación en materia de sanidad animal y la planificación, coordinación y evaluación de las CSG de ámbito estatal. En 1986, España ingresa en la Comunidad Europea y asume en su período transitorio la normativa comunitaria en materia de sanidad animal, publicándose la Orden de 28 de febrero de 1986 que constituye la legislación básica del Estado sobre normas para el desenvolvimiento de las CSG.

Es en este contexto cuando la Administración autonómica se hace cargo directamente de las CSG, de tal forma que en Galicia se establecen tres áreas de actuación (Díaz y cols., 1997):

- a) Área de erradicación obligatoria, constituida por ayuntamientos con un gran número de explotaciones saneadas y baja positividad
- b) Área de ampliación de campaña, constituida por ayuntamientos con un número de explotaciones saneadas menor que el grupo anterior y con una alta prevalencia de la enfermedad
- c) Área de iniciación, constituida por ayuntamientos en los que se desconocen las campañas de saneamiento, no se tiene información adecuada de la situación real de la cabaña y las actuaciones se realizarán por solicitudes previas.

La situación general de la cabaña de bovino en Galicia en el año 1989 era la siguiente: sobre 92.269 explotaciones revisadas (73% del total estimado de Galicia) y con 647.748 reses investigadas (alrededor del 77% del total estimado para Galicia), la positividad total, incluyendo todas las enfermedades objeto de campañas, era del 16.2% en establos y del 5.2% en animales (Díaz y cols., 1997). Con esta situación de partida, en el año 1990 se toma la decisión de declarar toda la CA como área de erradicación obligatoria adoptándose las siguientes medidas con respecto a la brucelosis bovina: prohibición de la vacunación, revisión de muestras de suero de todos los animales mayores de 12 meses por las técnicas de Aglutinación en microplaca con rosa Bengala (AMRB) y la Fijación de complemento (FC), sacrificio de los animales reaccionantes, repetición de ensayos en establos positivos cada dos meses y la necesidad de dos pruebas negativas seguidas para recuperar el estatus sanitario (Díaz y cols., 1997; European Communities, 2002).

## **1.5. Aspectos económicos de la brucelosis animal**

No existen muchos datos sobre los costes económicos de esta enfermedad. Por un lado están los costes relacionados con el control y por otro los derivados de las pérdidas económicas



debidas al descenso de las producciones de los animales. Las cantidades son muy variadas. Luna-Martínez y Mejía-Terán (2002) establecen que el coste de un aborto en ganado vacuno en Méjico tiene un coste entre 1.000 y 2.000 dólares con un descenso del 12% en la producción de leche al año siguiente. En el conjunto del rebaño afectado este descenso puede alcanzar el 60% de la producción. Otras estimaciones llevadas a cabo en Argentina, indican que las pérdidas anuales en este país por la brucelosis bovina alcanzarían los 60 millones de dólares (Sanmartino, 2002). Según Poester y cols. en 2002 las pérdidas ocasionadas por la brucelosis bovina en Brasil serían de 32 millones de dólares. Abdussalam y Fein en 1976 cifran las pérdidas en América Latina y USA en 700 millones de dólares anuales.

Blasco (1994) estima que las pérdidas originadas por la brucelosis bovina en España, en el año 1981, eran de 5.500 millones de pesetas. Otras estimaciones establecen las pérdidas económicas de la brucelosis animal en España en 14.000 millones de pesetas en 1992 sin contar los costes asociados a la enfermedad en el hombre (Blasco y Gamazo, 1994). El Programa Nacional de erradicación de brucelosis bovina presentado por España a la UE en el año 2006 tenía un coste superior a los 6,5 millones de euros (MAPA, 2006) y el de brucelosis ovina y caprina para el año 2007, su coste era casi de 32 millones de euros (MAPA, 2007b). El último programa presentado por España, para cofinanciación comunitaria de erradicación de brucelosis bovina, tiene un coste estimado de unos 20 millones de euros (MARM, 2009).

## 2. Etiología

### 2.1. Identificación y diferenciación de *Brucella* spp.

*Brucella* spp. es un bacilo corto Gram negativo, pequeño, inmóvil y aerobio estricto, de crecimiento lento, que no posee cápsulas, ni flagelos, ni fimbrias, no forma esporas y es intracelular facultativo, es decir, se puede multiplicar tanto en el interior como fuera de las células (Blasco y Gamazo, 1994; OIE, 2004). A diferencia de muchas otras bacterias, su genoma está constituido por dos cromosomas circulares y carece de plásmidos. Tienen un metabolismo oxidativo basado en la utilización de nitratos como aceptores de electrones. Son catalasa y oxidasa positivos (excepto *B. neotomae* y *B. ovis*), no atacan la gelatina, ni modifican la leche y en general no fermentan los azúcares; son bacilos muy exigentes, creciendo mejor en medios aerobios enriquecidos con CO<sub>2</sub>.

Las brucelas siempre se han agrupado en especies diferentes según distintos criterios como el de tipo de hospedador preferente. Además, en algunas de estas especies se han diferenciado biotipos o biovariedades siguiendo diferentes criterios. Dado que las bacterias están incluidas en la subdivisión  $\alpha$ -2 de las Proteobacterias y constituyen un grupo muy homogéneo se ha discutido la posibilidad de incluirlas en una sola especie (*B. mellitensis*) y considerar al resto de especies como biotipos. De todas formas siguiendo las recomendaciones de Moriyón y cols.

en 2001 y Moreno y cols. en 2002, en este estudio se utilizará el criterio clásico de clasificación de *Brucella* spp. (tabla 1).

**Tabla 1. Características diferenciales de especies del género *Brucella* (OIE, 2004)**

			Lisis por fagos <sup>a</sup>							
			Tb		Wb	Iz <sub>1</sub>	R/C			
Especies	Morfología de las colonias <sup>b</sup>	Requerimientos de suero	RTD <sup>c</sup>	10 <sup>4</sup> RTD <sup>c</sup>	RTD <sup>c</sup>	RTD <sup>c</sup>	RTD <sup>c</sup>	Oxidasa	Actividad Ureasa	Hospedador preferente
<i>B. abortus</i>	S	— <sup>d</sup>	+	+	+	+	—	+ <sup>e</sup>	+ <sup>f</sup>	Ganado vacuno y otros bóvidos
<i>B. suis</i>	S	—	—	+	+ <sup>g</sup>	+ <sup>g</sup>	—	+	+ <sup>h</sup>	Biovar 1: porcino
										Biovar 2: porcino, liebre
										Biovar 3: porcino
										Biovar 4: reno
										Biovar 5: roedores salvajes
<i>B. melitensis</i>	S	—	—	—	— <sup>i</sup>	+	—	+	+ <sup>j</sup>	Ovejas y cabras
<i>B. neotomae</i>	S	—	— <sup>k</sup>	+	+	+	—	—	+ <sup>h</sup>	Rata del desierto <sup>l</sup>
<i>B. ovis</i>	R	+	—	—	—	—	+	—	—	Carnero
<i>B. canis</i>	R	—	—	—	—	—	+	+	+ <sup>h</sup>	Perro

a Fagos: Tbilisi (Tb), Weybridge (Wb), Izatnagar1 (Iz<sub>1</sub>) y R/C

b Fase normal de presentación: S, lisa; R, rugosa

c RTD: dilución rutinaria de prueba

d *B. abortus* biovar 2 generalmente requiere suero para crecimiento en primer aislamiento

e Algunos aislamientos en África de *B. abortus* biovar 3 son negativos

f Velocidad intermedia, excepto la cepa 544 y algunas cepas de campo que son negativas

g Algunos aislados de *B. suis* biovar 2 no son, o solo parcialmente, lisados por el fago Wb or Iz<sub>1</sub>

h Velocidad rápida

i Algunos aislados son lisados por el fago Wb

j Velocidad lenta, excepto algunas cepas que son rápidas

k Placas o calvas pequeñas

l *Neotoma lepida*

En la tabla 1, se especifican las pruebas de diferenciación de las especies de *Brucella* spp. que son las siguientes: morfología de las colonias, requerimientos de suero, respuesta a la prueba de la oxidasa y a la de la ureasa y la lisis por fagos siendo esta última la más utilizada en la actualidad. Además, las formas lisas de *Brucella* spp. se pueden diferenciar en biovars por medio de cuatro pruebas adicionales: la exigencia de CO<sub>2</sub>, la producción de SH<sub>2</sub>, el crecimiento en presencia de distintas concentraciones de colorantes (tionina, fucsina básica y safranina) y la aglutinación con los antisueros mono-específicos anti-A y anti-M (tabla 2).

La existencia de biovars en *B. abortus* es una herramienta importante en la investigación de los focos precisamente en base a su variedad. Según Crespo y cols. en 1986a en la zona norte de España y desde 1976, de un total de 766 cepas de *B. abortus* investigadas, 750 correspondían al biovar 1 (97,91%). En Galicia, según los resultados obtenidos desde 2004, la situación se ha invertido. De un total de 273 aislamientos realizados en vacuno, 271 corresponden *B. abortus* biovar 3 (datos propios).

Tabla 2. Prueba de diferenciación de biovars de *Brucella* spp. (Marín y cols., 2002)

Especie	Biovariedad	Exigencia de CO <sub>2</sub>	Producción de SH <sub>2</sub>	Crecimiento en presencia de colorantes <sup>a</sup>			Aglutinación con sueros <sup>b</sup>	
				Tionina	Fucsina básica	Safranina	A	M
<i>B. mellitensis</i>	1	-	-	+	+	+	-	+
	2	-	-	+	+	+	+	-
	3	-	-	+	+	+	+	+
<i>B. abortus</i>	1	+ <sup>c</sup>	+	-	+	+	+	-
	2	+ <sup>c</sup>	+	-	-	-	+	-
	3	+ <sup>c</sup>	+	+	+	+	+	-
	4	+ <sup>c</sup>	+	-	+ <sup>d</sup>	+	-	+
	5	-	-	+	+	+	-	+
	6	-	-	+	+	+	+	-
	9	+ o -	+	+	+	+	-	+
<i>B. suis</i>	1	-	+	+	- <sup>e</sup>	-	+	-
	2	-	-	+	-	-	+	-
	3	-	-	+	+	-	+	-
	4	-	-	+	- <sup>f</sup>	-	+	+
	5	-	-	+	-	-	-	+
<i>B. neotomae</i>		-	+	- <sup>g</sup>	-	-	+	-
<i>B. ovis</i>		+	-	+	- <sup>f</sup>	-	-	-
<i>B. canis</i>		-	-	+	- <sup>f</sup>	-	-	-

<sup>a</sup> Concentración de 20 µg/ml de tionina y fucsina básica y de 100 µg/ml de safranina en medio suero dextrosa agar

<sup>b</sup> A= suero monoespecífico anti-A; M= suero mono específico anti-M.

<sup>c</sup> Positivo para la mayoría de las cepas.

<sup>d</sup> Algunas cepas aisladas en Canadá, Gran Bretaña y USA son inhibidas por la fucsina básica.

<sup>e</sup> Algunas cepas resistentes a la fucsina básica se han aislado en América del Sur y en el sudeste asiático.

<sup>f</sup> Negativo para la mayoría de las cepas.

<sup>g</sup> Crecimiento a una concentración de tionina de 10 µg/ml.

## 2.2. Estructura antigénica de *Brucella* spp.

Las bacterias del género *Brucella* spp. son microorganismos Gram negativos que se caracterizan, entre otras cosas, por presentar una membrana interna citoplasmática y otra externa, dejando entre ambas un espacio denominado periplásmico.

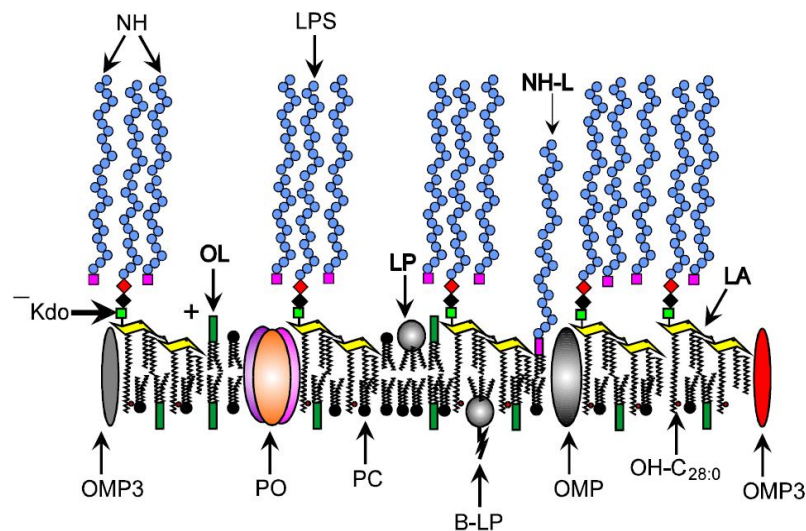
Las especies de *Brucella* spp. pueden ser clasificadas en lisas (S, smooth) o en rugosas (R, rough) en función del aspecto que presenten las colonias en medio sólido. Esta característica está determinada por la presencia o no de la cadena O del lipopolisacárido (LPS) de la membrana externa (figura 2). Las cepas silvestres de *B. mellitensis*, *B. abortus*, *B. suis* y *B. neotomae* son de tipo liso, aunque pueden presentar mutantes rugosos derivados de las anteriores, mientras que *B. ovis* y *B. canis* presentan cepas de tipo rugoso de modo natural (Moriyón, 1986; OIE, 2004).

Los principales componentes de la membrana externa y de la citoplasmática son el fosfolípido, y las proteínas. Ambas membranas presentan una estructura bicapa, pero la parte

exterior de la externa (en contacto con el medio) presenta como componente más característico un LPS que constituye el antígeno (Ag) más importante desde el punto de vista del diagnóstico (figura 1) y que es capaz, a diferencia del LPS de otras enterobacterias, de producir una respuesta de Ac IgM e IgG muy fuerte (Moreno y cols., 1998).

**Figura 1. Estructura (principales componentes y distribución) de la envoltura externa de una *Brucella* spp. lisa (Moreno y cols., 1998)**

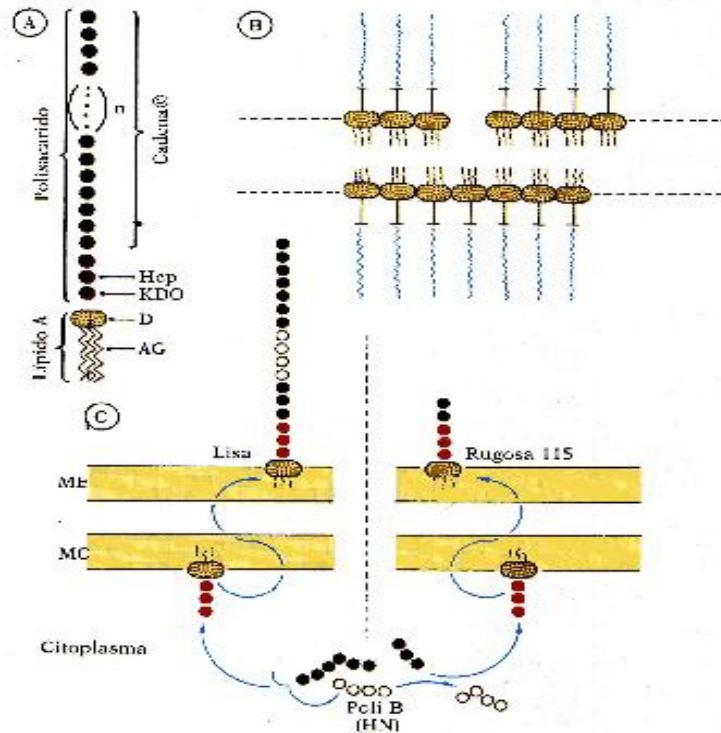
(**Kdo**) 2-ceto,3-deoxioctulosonato; (**LA**) lípido A; (**LP**) lípido libre; (**B-LP**) lípido ligado; (**LPS**) lipopolisacárido; (**NH**) hapteno nativo; (**NH-L**) lípido unido a NH; (**PC**) fosfatidilcolina; (**OH-C<sub>28:0</sub>**) ácido graso hidroxilado; (**OL**) lípidos de ornitina; (**OMP**) proteínas de la membrana externa; (**OMP3**) proteínas de la membrana externa del grupo 3 y (**PO**) porinas.



El LPS es una molécula compleja, de gran tamaño, formada por un Lípido A (glucolípid) insertado en la membrana y una cadena polisacáridica hacia el exterior. Esta cadena está formada por dos partes:

- Núcleo: situado en la parte más interna, entre el lípido A y la cadena O, formado por azúcares: glucosamina, manosa y glucosa principalmente.
- Cadena O: es la fracción más externa y está formada por un homopolímero de perosamina dispuesto linealmente hacia el exterior (N-formil-perosamina).

La cadena O es el Ag más importante de *Brucella* spp. en fase lisa y es el que permite diferenciar a las cepas lisas de las rugosas, careciendo estas últimas de él (figura 2). Sin embargo, no es específico de *Brucella* spp. sino que está presente en otras especies de Gram negativas y es el responsable de la aparición de falsas reacciones positivas, siendo de especial importancia para el control de la brucelosis las originadas por *Yersinia enterocolitica* O:9 (Nielsen y cols., 2004 ; Mainar-Jaime y cols., 2005; Estein, 2006).

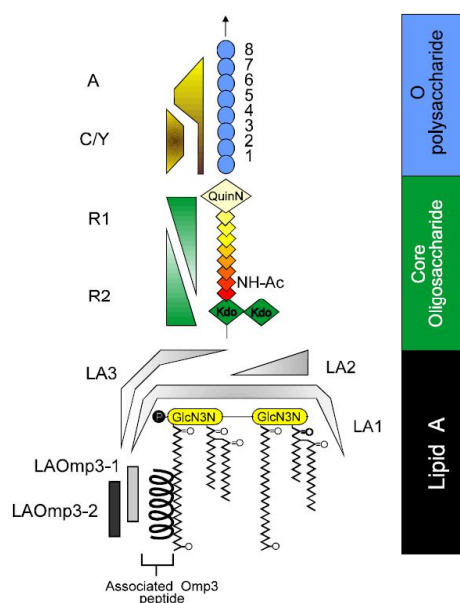
Figura 2. Diferencias estructurales entre una cepa lisa y una rugosa de *Brucella* spp. (Moriyón, 1986)

A.-Composición básica del S-LPS; B.-Disposición micelar de los LPS-S en solución acuosa; C.-Disposición esquemática de la membrana externa e interna de *Brucella* spp. y la diferencia de las cepas lisas y rugosas en relación a la diferente composición del LPS.

En las figuras 3 y 4 se representan de forma esquemática los principales epítomos de la membrana externa de *Brucella* spp. La cadena O contiene cuatro tipos de epítomos: A, M, C y C/Y. El C/Y y el C se encuentran en todos los LPS de cepas lisas. El epítomo A es característico de *B. abortus* biotipo 1 y el epítomo M es característico de *B. mellitensis* biotipo 1. Algunas cepas de bacterias pueden contener ambos como sucede en *B. suis* biotipo 4 (Moreno y cols., 1998). Los epítomos de la cadena O difieren en el número de unidades de N-formil-perosamina y en el tipo de enlace entre estas moléculas. De esta forma, el epítomo A incluiría más de 4 unidades de N-formil-perosamina en enlace  $\alpha$  1-2, el epítomo M incluiría al menos un enlace  $\alpha$  1-3 y el epítomo C incluiría menos de 5 unidades de N-formil-perosamina en enlace  $\alpha$  1-2 (figura 4). El epítomo C/Y (figura 3) estaría compuesto entre dos y cuatro unidades de N-formil-perosamina en enlace  $\alpha$  1-2 y sería el responsable de reacciones cruzadas con *Yersinia enterocolitica* O:9 (Rojas y cols., 1994). Si bien el epítomo C y el C/Y son muy similares, mediante el uso de Ac monoclonales (Mab) se ha podido observar que algunos de ellos reaccionan tanto con el LPS liso (LPS-S) de *Brucella* spp. como con el de *Yersinia* spp., pero otros solo reaccionan con el LPS-S de *Brucella* spp. por lo que deben existir diferencias entre ambos epítomos (Muñoz y cols., 2005). El modelo

clásico de Wilson y Miles según el cual existían dos tipos de epítomos en diferentes proporciones (A y M) en *Brucella* spp. se ve modificado por la presencia de epítomos comunes (C) que explicarían el por qué en el diagnóstico serológico es irrelevante si el origen del Ag es *B. abortus* o *B. mellitensis*. (Moriyón y López-Goñi, 2002).

**Figura 3. Representación de la más probable distribución de epítomos a nivel de la cadena O y del lípido A del LPS de *B. abortus* biotipo 1 (Rojas y cols., 1994)**

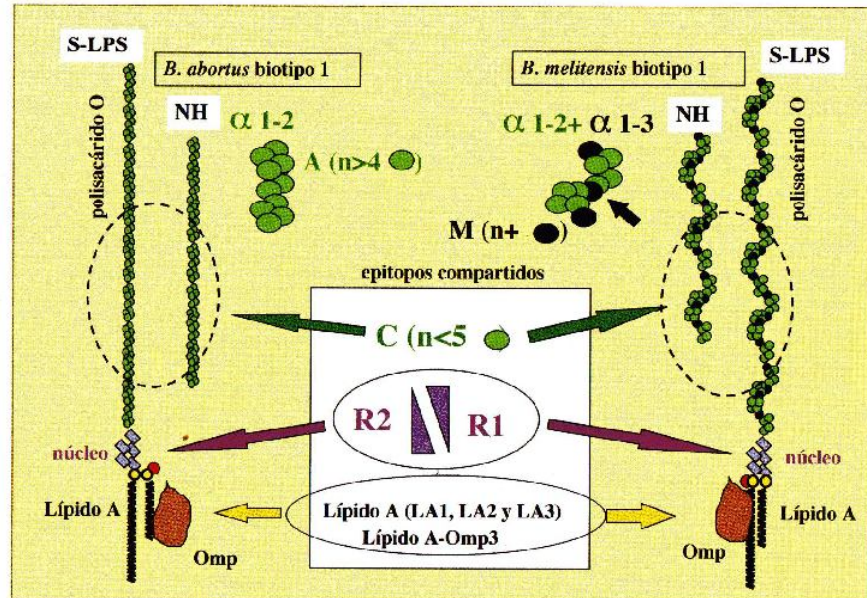


El núcleo del oligosacárido está compuesto básicamente por glucosamina, glucosa, manosa y quinovosamina. En los mutantes rugosos esta sección está incompleta, faltando la quinovosamina. Mediante el uso de Mab se han identificado los epítomos R1 y R2 (figuras 3 y 4) frente a los que se producen Ac en animales y personas infectadas (Moriyón y López-Goñi, 2002).

El lípido A de *B. abortus* está formado por glucosamina y diaminoglucosa, además de ácidos grasos hidroxilados y no hidroxilados de cadena larga. Aunque se han identificado diferentes epítomos en el lípido A (figuras 3 y 4) comunes a otras enterobacterias las reacciones cruzadas entre ambas no parecen interferir en el diagnóstico serológico habitual (Moriyón y López-Goñi, 1994).

Las brucelas en fase lisa contienen un segundo polisacárido con una estructura muy similar a la cadena O del LPS, pero, a diferencia de ésta, no se encuentra unida al núcleo y se denomina hapteno nativo (NH) que durante mucho tiempo se identificó con la cadena O en forma libre y no es inmunogénico, aunque reacciona con Ac producidos durante la infección (Moriyón y López-Goñi, 2002). El NH no está unido a otros azúcares, aunque sí estarían asociados a la cadena O, pero sin formar parte de ella (figura 1).

Figura 4. Modelo esquemático de la distribución de epítomos en los LPS-S y NH de los biotipos 1 de *B. abortus* y de *B. melitensis* (Moriyón y López-Goñi, 2002).



La membrana externa también contiene en su composición dos grupos de proteínas (OMPs mayores y OMPs menores) de acuerdo a su abundancia relativa. En las cepas rugosas estas proteínas están muy expuestas mientras que en las cepas lisas los Ac tienen muchas dificultades para acceder a ellas debido a la cadena O del LPS. Existen varios grupos de proteínas mayoritarios: Grupo I (peso entre 88-94 K), Grupo II (peso entre 36-38 K), Grupo III (peso entre 25-31 K) y las lipoproteínas, de bajo peso molecular. Su actividad antigénica varía de animal a animal y no parecen muy adecuadas para diagnóstico.

Los componentes citosólicos incluyen ácidos nucleicos y ribosomas, y una variedad de proteínas enzimáticas relacionadas con el metabolismo energético, con la biosíntesis y con la regulación genética (Moriyón y López-Goñi, 2002). Los patrones inmunoelectroforéticos de las proteínas del citoplasma son prácticamente idénticos entre todas las especies de *Brucella* spp. y se consideran específicos para el género, aunque se han observado reacciones cruzadas con bacterias taxonómicas próximas. Sin embargo, estas reacciones no se han observado con bacterias cuyos antígenos LPS muestran reacción cruzada con los LPS-S de *Brucella* spp. (Moriyón y cols., 2001). Las proteínas de la fracción soluble (citosólicas y periplásmicas) inducen hipersensibilidad retardada lo que se ha utilizado para diagnóstico por medio de la brucelina que es una mezcla de proteínas de origen celular no identificado, pero diferentes de las proteínas de la membrana. La utilización de este compuesto por vía intradérmica está incluida como técnica de



diagnóstico de brucelosis en el Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres (MPDOIE).

El principal componente del espacio periplásmico es la mureína o péptidoglicano, aunque también se han identificado diversos tipos de proteínas de las que destaca la superóxido dismutasa (SOD). Algunas de estas son antigénicas para el hospedador, pero los Ac producidos frente a esas proteínas tienen un valor diagnóstico reducido (Moriyón y López-Goñi, 2002). Una parte de las mismas entrarían a formar parte de la brucelina.

### 2.3. Resistencia en el medio ambiente

*Brucella* spp. tiene una gran resistencia en el medio ambiente a pesar de no presentar esporos, lo que garantiza su enorme potencial de contagiosidad para el resto de animales. En general, necesita humedades relativas elevadas y bajas temperaturas. La temperatura elevada inactiva el microorganismo e impide la transmisión de la enfermedad por la leche. Los tiempos de supervivencia de *Brucella* spp. en diferentes condiciones ambientales se muestran en la tabla 3.

**Tabla 3. Tiempos de supervivencia de *Brucella* spp. en determinadas condiciones ambientales. Modificado de Barberán y Blasco, 2002**

Medio	Condiciones	Supervivencia
Sol directo	< 31 °C	4 h 30 min
Agua	- 4°C	4 meses
Agua de laboratorio	20 °C	2,5 meses
Tierra	Seca en laboratorio	< 4 días
	Seca a 18 °C	69-72 días
	Mojada	< 7 días
	Otoño (90% humedad)	48-73 días
Heces/estiércol	Verano	24 horas
	Invierno	2 meses
	25 °C	1 mes
	8 °C	1 año
	- 3°C	3 meses
Purines o estiércol líquido	Verano	3 meses
	Invierno	6 meses
	En cuba	1,5 meses
	En cuba a 12 °C	Meses
Heno		Varios días a meses
Polvo		3-44 días
Pasto	Soleado	< 5 días
	Sombrio	> 6 días



### 3. Epidemiología

#### 3.1. *Distribución de la brucelosis animal en el mundo*

La situación de la brucelosis es muy diferente según la zona considerada. En la UE y en América del Norte la evolución de la enfermedad ha sido muy favorable, existiendo amplias zonas libres. Sin embargo, en otras zonas, por ejemplo en Oriente Próximo, el número de casos está aumentando. A continuación se describe la situación en distintas regiones del mundo.

**EUROPA.** La aplicación de programas de erradicación con diagnóstico adecuado, vacunaciones y sacrificio de positivos ha permitido que muchos países de la UE estén libres de brucelosis tanto bovina como ovina y caprina. La Decisión de la Comisión de 5 de agosto de 2009 (2009/600/CE) establece la relación de países oficialmente indemnes de brucelosis bovina e incluye a los siguientes: Bélgica, República Checa, Dinamarca, Alemania, Irlanda, Francia, Luxemburgo, Países Bajos, Austria, Polonia, Eslovenia, Eslovaquia, Finlandia y Suecia. Además, incluye con el mismo estatus determinadas regiones de Italia, Portugal, España y Reino Unido. En este último país destacar que la región afectada de brucelosis bovina corresponde a Irlanda del Norte estando libre de la enfermedad Inglaterra, Escocia y Gales. Los países más afectados por brucelosis bovina corresponde a los del área mediterránea: Portugal, España, Italia, Malta, Chipre y Grecia, además de Irlanda del Norte. La Decisión de la Comisión del 26 de noviembre de 2009 (2009/883/CE) establece los programas anuales y plurianuales de erradicación, control y vigilancia aprobados para financiación por la UE. Entre ellos figuran los programas para control y erradicación de la brucelosis bovina presentados por España, Italia, Chipre, Malta, Portugal y Reino Unido. La situación en otros países pertenecientes a la UE no incluidos entre los anteriores es la siguiente: Bulgaria está libre desde 1958, Estonia desde 1961, Hungría desde 1985, Letonia desde 1963, Lituania desde 1992 y Rumanía desde 1969 (OIE, 2010). Noruega también está considerada como libre de la enfermedad (Godfroid y Käsbohrer, 2002).

La distribución de la brucelosis ovina y caprina por *B. mellitensis* no difiere mucho de la brucelosis bovina, siendo los países del área mediterránea los más afectados. La Decisión de la Comisión del 11 de junio de 2007 (2007/399/CE) incluye a los siguientes países en la lista de oficialmente libres: Bélgica, República Checa, Dinamarca, Alemania, Irlanda, Luxemburgo, Hungría, Países Bajos, Austria, Polonia, Rumanía, Eslovenia, Eslovaquia, Finlandia, Suecia y Reino Unido. La Decisión de la Comisión del 26 de noviembre de 2009 (2009/883/CE) también incluye la lista de programas de control y erradicación frente a esta enfermedad financiados por la UE, resultando aprobados los de los siguientes países: España, Italia, Chipre y Portugal. La situación de otros países pertenecientes a la UE y no incluidos en las listas anteriores es la siguiente: Bulgaria está libre desde 1941, en Estonia, Lituania y Letonia nunca ha sido declarada la enfermedad (OIE, 2010). Noruega también está considerada libre de esta enfermedad

(Godfroid y Käsbohrer, 2002). Esta enfermedad también tiene una especial importancia en otros países del área mediterránea como son Macedonia, Serbia o Kosovo (Taleski y cols., 2002).

Los retos más importantes a los que se enfrenta la erradicación de la brucelosis en los países de la UE son tres: la existencia de reacciones cruzadas por *Yersinia enterocolitica* O:9, la existencia de reservorios salvajes de la enfermedad, particularmente en jabalíes, y la aparición de infecciones por *B. mellitensis* en vacuno en áreas en las que conviven con ovejas (Godfroid y Käsbohrer, 2002).

**AMERICA.** La situación es muy variada según los países. En general, la situación ha mejorado en los últimos años, pasando de 13.000.000 de cabezas libres de brucelosis bovina 1993 a 87.000.000 de cabezas en 1998, localizándose los principales avances en EEUU y en Cuba (Centro Paramericano de Fiebre Aftosa, 2000).

Canadá es un país libre desde 1989 (OIE, 2010) y para EEUU el año 2000 fue el primero en la historia del control de la enfermedad en el que no se dio ningún caso (Ragan, 2002).

Méjico es uno de los países más afectados por brucelosis de América. Por especies, están afectados los bovinos, ovinos y caprinos. Esta última es la principal especie responsable de la enfermedad en humanos (Luna-Martínez y Mejía-Terán, 2002).

En Guatemala, Honduras, El Salvador, Nicaragua, Costa Rica y Panamá, todos ellos pertenecientes a América Central se ha identificado brucelosis en bovino por *B. abortus* y en porcino por *B. suis*. Además se ha identificado en ovino y caprino por *B. mellitensis* en Guatemala (Moreno, 2002).

En Venezuela, la brucelosis también constituye un importante problema en sanidad animal y salud pública (Francisco y Vargas, 2002).

Brasil, con una cabaña de 160 millones de cabezas de ganado vacuno, es uno de los países con mayor censo de toda América. La cabaña está afectada por brucelosis bovina debida a *B. abortus* por todo el país. Sin embargo, la brucelosis en pequeños rumiantes es poco relevante de forma que *B. mellitensis* nunca se ha aislado (Poester y cols., 2002).

La enfermedad en Argentina también es importante. Se ha diagnosticado en bovino, ovino, caprino, porcino y perros, y se han aislado todas las especies de *Brucella*. (Samartino, 2002).

**ASIA.** En China se ha informado la presencia de la enfermedad en 25 de las 32 provincias que la forman, existiendo algunas áreas endémicas. La principal cepa aislada en personas enfermas fue *B. mellitensis* y, en menor medida, *B. abortus* y *B. suis*. Se estima que aproximadamente el 6% del ganado vacuno está afectado de brucelosis sobre un censo de 100 millones de animales (Deqiu y cols., 2002).

En India la enfermedad está difundida por todo el país, estimándose que el 5% del ganado vacuno y el 3% de los búfalos están infectados. También se ha detectado la enfermedad en ovejas, cabras y cerdos (Renukaradhya y cols., 2002).

En Sri Lanka los animales más afectados son el ganado vacuno y el búfalo por *B. abortus*. En otras especies la enfermedad es poco común, aunque se ha detectado en ovinos y caprinos originada por *B. mellitensis* (Bandara y Mahipala, 2002).

**ORIENTE PROXIMO.** Existe un gran número de países en los que se ha descrito la enfermedad: Arabia Saudí, Kuwait, Israel, Oman, Iraq, Irán, Siria, Sudán, Egipto, Libia, Somalia, Jordania, etc. La brucelosis afecta a casi todas las especies domésticas, particularmente al ganado vacuno, ovejas y cabras. Otras especies afectadas son los camellos, búfalos, equinos y cerdos. La principal especie implicada es la *B. mellitensis* que además es la responsable de la mayor parte de los casos de brucelosis humana (Refai, 2002).

**AFRICA SUBSAHARIANA.** La situación de la brucelosis en esta parte del mundo está descrita por McDermott y Arimi (2002). Es una enfermedad importante, si bien se conoce poco su situación real debido a la falta de estudios epidemiológicos y de programas de control, inexistentes en casi toda el área, excepto en África Oriental y África del Sur. La existencia de otros graves problemas sanitarios y la falta de recursos limitan la aplicación de programas específicos frente a esta enfermedad por parte de las autoridades sanitarias de los diferentes países. La prevalencia de la enfermedad es especialmente importante en las zonas áridas y semiáridas ligadas a los sistemas de pastoreo tanto en bovino como en ovino y caprino. En los sistemas ligados a la agricultura la prevalencia es mucho menor, probablemente relacionado con el menor contacto entre animales de diferentes procedencias y a la baja densidad de población de este tipo de ganado, a pesar de no existir programas específicos de control. En los países de la zona húmeda y de África Central prácticamente no existe información con respecto a la enfermedad y carecen de infraestructuras en servicios de sanidad animal. En ganado vacuno se ha constatado la presencia de brucelosis por *B. abortus* como principal especie, pero también de *B. mellitensis*. En ovejas y cabras se ha informado que la principal especie responsable de la enfermedad es la *B. mellitensis*. De todas formas, la prevalencia informada en ovejas y cabras es bastante menor que la del ganado bovino, si bien se la relaciona como principal agente responsable de la brucelosis en personas. La brucelosis porcina por *B. suis* ha sido detectada en varios países de esta área, aunque en un número reducido de casos, pero que puede ser indicativo de que el microorganismo este extendido por muchos otros. Otras especies afectadas por *B. abortus* son los camellos, presentes en las áreas de pastoreo de zonas áridas y semiáridas de los países del este, oeste y del centro de África. *B. abortus* también se ha aislado de diversos herbívoros y carnívoros salvajes. Los programas oficiales de control son muy reducidos y disponen de un nivel de recursos muy limitados, además ha disminuido su intensidad en los últimos años. Se han aplicado en los últimos años en los países del sur de África (Mozambique, Sudáfrica, Namibia, Botswana, Lesoto o Zimbabwe). Como consecuencia de estos programas se ha informado de la erradicación de la enfermedad en bovinos en Lesoto. También se ha

informado de la erradicación de la enfermedad en ovinos y caprinos en Botswana (1995), Zimbabwe (1996) y Sudáfrica (1999).

### **3.2. Evolución y situación actual de la brucelosis en España**

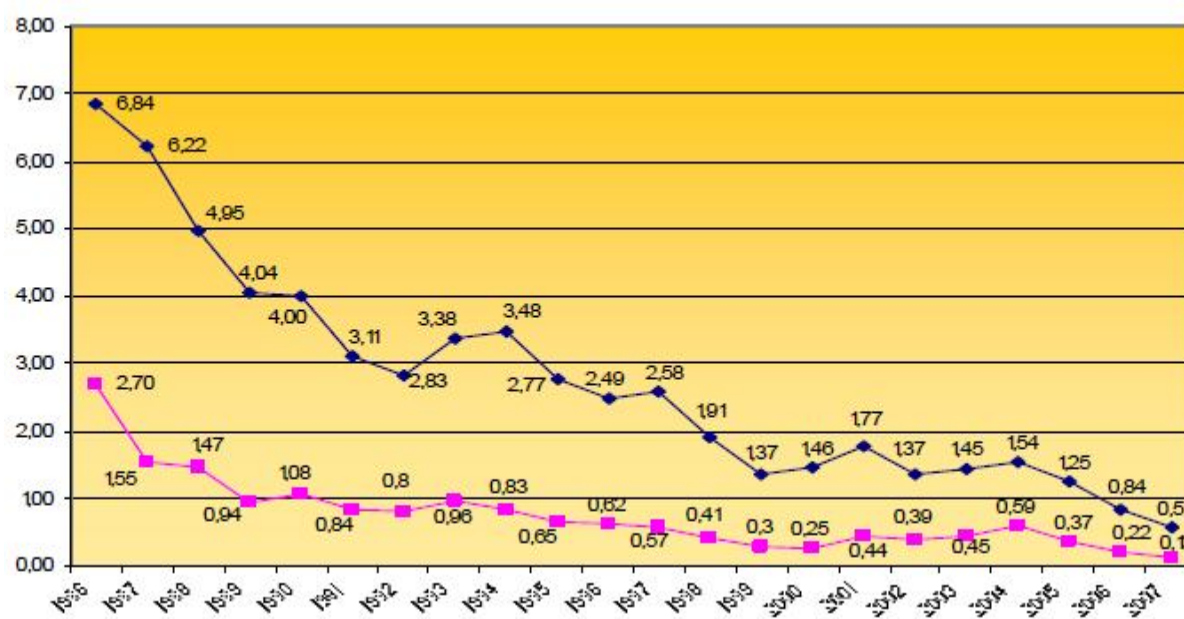
La evolución de la brucelosis, tanto bovina como de pequeños rumiantes, ha sido favorable en España desde la década de los años 80. Desde la aparición de la enfermedad, siempre tuvo una prevalencia mayor la de los pequeños rumiantes que la de bovino y a día de hoy la situación de la primera es bastante peor que la de la segunda.

Las principales medidas adoptadas para el control de la brucelosis bovina en España que dieron lugar a los PNE están descritas por Blasco (1986, 1994). La Ley de epizootias de 1952 establecía medidas concretas para el control de la brucelosis bovina que implicaron la realización de campañas poco planificadas, con pocos recursos y con resultados muy limitados. En 1978 se inicia un PNE de brucelosis para el ganado vacuno de leche que constituye la base de los programas posteriores. Este plan contemplaba tres fases en la erradicación. La primera fases desde 1979 a 1985, la segunda desde 1986 a 1990 y la tercera desde 1991 a 1995. El objetivo era conseguir la erradicación de la enfermedad en vacuno al final de la terecer fase. Posteriormente, esta normativa se adaptó a la directiva 64/432 CEE con la entrada de España en la Comunidad Europea. Evidentemente, el programa no alcanzó los objetivos previstos y la situación a finales de 1990 contemplaba una positividad del 7,8% en establos y del 1,08% en animales. Al final de la tercera fase, la situación era de una prevalencia por establo del 2,49% y de una incidencia del 0,62% en animales.

En 1996 se inicia una nueva etapa en el control de la brucelosis con la publicación del RD 2611/96 que establece los PNE de enfermedades de los animales. Las principales medidas incluidas en este RD para el control de la brucelosis bovina son: la calificación de las explotaciones en B1, B2, B3 y B4, la prohibición de vacunación en todo el territorio nacional, excepto en explotaciones problemáticas y la creación del Comité Nacional de Cooperación y Seguimiento de los PNE de Enfermedades Animales con la representación de las Comunidades Autónomas (CCAA). En los años siguientes la legislación se irá modificando para subsanar las deficiencias detectadas en la ejecución de los programas, para incorporar los avances en los métodos de diagnóstico y para asegurar un mayor control de todos los movimientos de los animales (MAPA, 2006; MAPA, 2007a).

Desde al año 1997 al 2000 se puede apreciar un marcado descenso en la prevalencia de la enfermedad tanto a nivel de rebaños como de animales (figura 5). A partir del año 2001 la tendencia se invierte y vuelven a aumentar la prevalencia de la enfermedad hasta el 2004 debido a la aparición de focos en determinadas CCAA: Castilla-León, Castilla La Mancha, Extremadura y Cantabria (tabla 4).

Figura 5. Prevalencia de rebaño e incidencia en animales en el período 1986-2007 de brucelosis bovina en España (MARM, 2008)



La línea azul indica la prevalencia de rebaño y la línea rosa indica la incidencia en animales

Tabla 4. Evolución de la prevalencia de brucelosis bovina por establos en España en el período 2001-2008 (MARM, 2009)

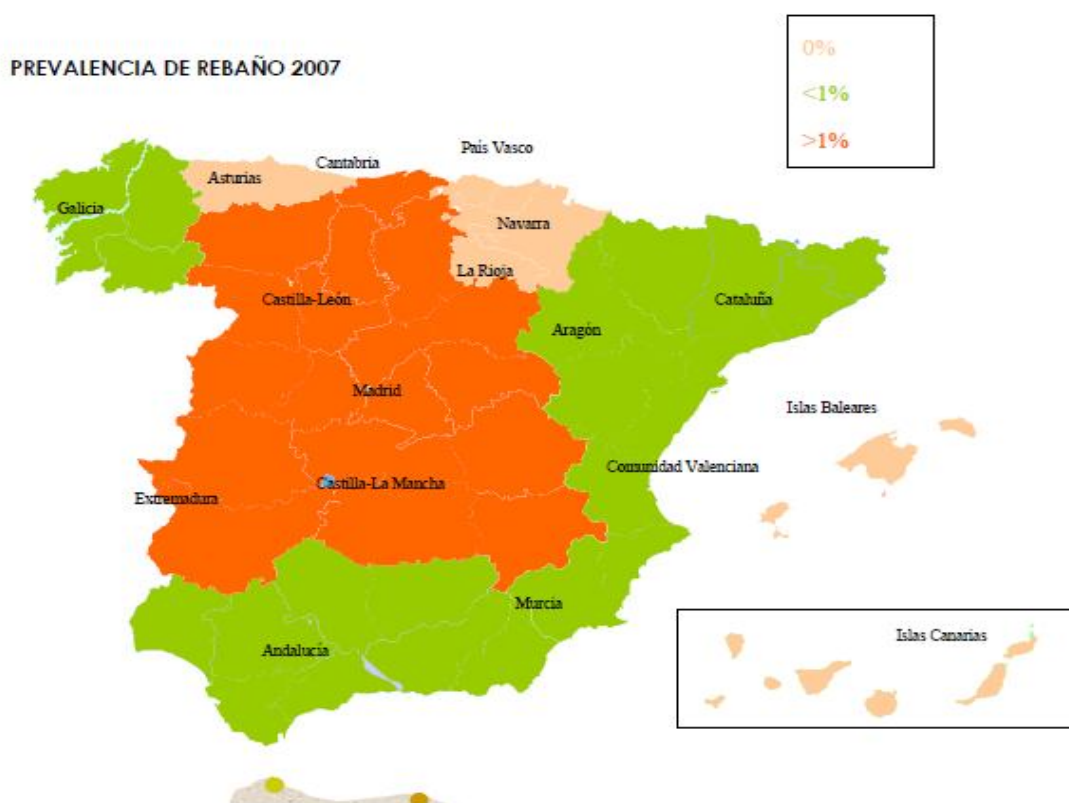
CCAA	EVOLUCIÓN DE LA PREVALENCIA DE REBAÑO (EN %)							
	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008
ANDALUCÍA	3,08	2,70	2,70	2,66	1,91	0,95	1,00	0,36
ARAGÓN	1,44	1,44	2,66	1,68	0,64	0,29	0,27	0,00
ASTURIAS	0,31	0,34	0,22	0,19	0,19	0,04	0,00	0,01
BALEARES	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
CANARIAS	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
CANTABRIA	4,81	3,27	5,49	3,84	1,54	0,66	1,04	0,98
CASTILLA LA MANCHA	2,46	2,52	3,45	5,23	2,71	1,91	1,09	0,72
CASTILLA Y LEÓN	3,80	3,59	3,52	3,40	3,35	2,78	1,44	1,15
CATALUÑA	3,62	0,54	1,34	1,18	0,91	0,34	0,21	0,16
EXTREMADURA	3,03	3,71	2,94	6,15	5,76	3,98	2,17	1,39
GALICIA	0,38	0,30	0,26	0,17	0,09	0,06	0,11	0,06
LA RIOJA	0,81	0,00	0,00	1,23	0,00	0,00	0,00	0,00
MADRID	0,91	0,43	1,68	2,23	1,35	2,07	1,51	1,03
MURCIA	3,28	0,00	0,00	0,89	0,00	0,26	0,72	0,00
NAVARRA	0,34	0,25	0,04	0,00	0,00	0,00	0,00	0,06
PAÍS VASCO	0,20	0,57	0,13	0,11	0,25	0,04	0,00	0,00
VALENCIA	2,33	0,68	0,67	1,16	0,99	0,00	0,19	0,00
TOTAL	1,77	1,37	1,45	1,54	1,25	0,84	0,57	0,40

En el programa de control presentado por España en 2005 se establecía la diferenciación de actuaciones según la prevalencia de la enfermedad y según se tratase de vacuno de leche o de vacuno de carne, con tres grupos de actuación: CCAA con un rango de prevalencia de rebaño inferior al 1%, CCAA con un rango de prevalencia de rebaño mayor del 1% y menor del 5% y CCAA con un rango de prevalencia de rebaño mayor del 5%.

En el 2006 se presenta un nuevo programa de actuaciones con una duración hasta el año 2011. A partir de los datos del año 2004 y con el objetivo de invertir la tendencia al alza observada en 2003 y 2004 (tabla 4), este programa contempla dos situaciones sanitarias diferenciadas en las que deben adoptarse estrategias distintas según la prevalencia. Por un lado existen CCAA con una prevalencia de rebaño de 0% y CCAA con una prevalencia de rebaño inferior a 1% y, por otro, CCAA con una prevalencia de rebaño superior a 1% (MAPA, 2006). En la figura 6 se puede observar la prevalencia de la enfermedad en explotaciones de bovino por CCAA correspondiente al año 2007. En las dos primeras áreas el objetivo es el mantenimiento de la prevalencia cero donde ya existe y alcanzar este estatus sanitario en las zonas con prevalencia menor del 1%. En la tercera área el objetivo es reducir la prevalencia a nivel de erradicación. Adicionalmente a las medidas habituales de investigación serológica y vacíos sanitarios, en esta tercera zona se establece la posibilidad de vacunación según la prevalencia y utilizando la comarca como área de actuación (MAPA, 2006).

Los datos de 2006 y 2007 (tabla 4) permiten observar una evolución favorable de la enfermedad aunque se siga manteniendo la vacunación de hembras en las CCAA con una prevalencia de rebaño superior a 1%, si bien en el programa del 2007 su uso queda circunscrito a varias comarcas de las CCAA de Castilla-León y Extremadura (MAPA, 2007a).

**Figura 6. Mapa de prevalencias por rebaño de brucelosis bovina en España en el año 2007 (MARM, 2008)**



El programa presentado para cofinanciación en 2009 establece que las medidas adoptadas contra la brucelosis tienen como objetivo la erradicación de la enfermedad, considerando como tal el mantenimiento de al menos un 99,8% de rebaños calificados como oficialmente libres de brucelosis durante 5 años consecutivos y que no se produzcan aislamientos, ni casos de abortos por *B. abortus* durante al menos 3 años. Los datos de prevalencia por rebaño en 2008 son especialmente satisfactorios (tabla 4), sobre todo en las CCAA del Norte, en donde la prevalencia está muy próxima a cero. Solo tres CCAA presentan una prevalencia por establo superior al 1%: Madrid, Castilla-León y Extremadura. La principal novedad incluida en el programa del 2009 es el control, por primera vez, de los cebaderos en aquellas zonas en las que se haya logrado la erradicación de la enfermedad (MARM, 2009).

Las principales especies responsables de la enfermedad en bovinos, en España, son la *B. abortus biovar 1* y, en menor medida, *B. abortus biovar 3*, (Crespo y cols., 1986a; Crespo y cols., 1986b).

### **3.3. Evolución y perspectivas de la brucelosis bovina en Galicia**

Como se puede observar en la tabla 5 la evolución de la brucelosis, en su conjunto, ha sido favorable desde el año 1990, en relación a las explotaciones y a los animales con positividad. También se puede observar como el tiempo necesario para alcanzar una prevalencia por explotación inferior al 0,2%, incluso partiendo de prevalencia baja, es largo (en Galicia, el período es de 14 años con una prevalencia inicial en 1990 del 2.5%). Otro dato significativo lo constituye el importante descenso del número de explotaciones desde 1990 hasta 2008 pasando de 120.443 a 42.545. Sin embargo el descenso del número de animales es mucho menos significativo, pasando de 810.950 a 669.498 lo que indica una importante concentración con un aumento muy significativo del tamaño medio de las explotaciones.

Al igual que en el resto de España, a partir del año 1997, y sobre todo del año 1998, se puede observar una tendencia clara de descenso de la enfermedad. En el año 2001 se da una situación anómala en el desarrollo de la ejecución de los programas de control relacionada con problemas laborales de los equipos veterinarios que trae como consecuencia un aumento en la prevalencia de la enfermedad. Sin embargo, este dato está sesgado en el sentido de que de las 40.000 explotaciones revisadas se encuentran las pertenecientes a las zonas con brucelosis endémica en Galicia (zonas de montaña principalmente de Ourense, Lugo y Pontevedra) que desvirtúan la situación real de la enfermedad. De todas formas en el año 2002, con la revisión del total de explotaciones, se puede apreciar un incremento en el número de explotaciones positivas, pero no en el número de animales. En este año, también se inicia el desarrollo de un programa especial de control de la enfermedad sobre unas 30.000 vacas de la provincia de Ourense con una prevalencia por establo del 6% aproximadamente. A partir del año 2003 el descenso es continuo de forma que a partir del 2004 Galicia cumple por primera vez el límite de explotaciones positivas por debajo del 0,2% lo que sitúa a la CA en la senda de zona oficialmente libre de brucelosis.

La situación actual de la enfermedad en Galicia muestra dos zonas perfectamente diferenciadas. La primera de ellas ocupa la mayor parte de la CA y está prácticamente libre de la enfermedad con la aparición de brotes muy esporádicos. La otra zona está constituida por pequeñas áreas de montaña (básicamente en la provincia de Lugo) con animales en pastoreo, en régimen de semilibertad, en las que se concentran más del 90% de los brotes. En estas zonas se ha intensificado el uso de técnicas altamente sensibles (AMRB y ELISA indirecto (ELISAI)), disminuyendo el intervalo de control y aumentando el número de vacíos sanitarios, entre otras medidas. La incorporación de controles en tanque de leche por la técnica de ELISA implantada en el año 2006 ha sido especialmente beneficiosa para la detección temprana de brotes en las zonas lecheras.

**Tabla 5. Evolución de la brucelosis bovina en Galicia (Fuente: Xunta de Galicia)**

AÑO	EXPLOTACIONES			RESES		
	REVISADAS	POSITIVAS	%	MUESTREADAS	POSITIVAS	%
1990	120.443	3.012	2,501	810.950	5.216	0,643
1991	126.105	1.751	1,389	844.227	2.609	0,309
1992	114.636	1.045	0,912	788.973	1.581	0,200
1993	107.842	1.160	1,076	802.184	3.048	0,380
1994	102.870	919	0,893	800.121	2.480	0,310
1995	99.020	571	0,577	788.530	2.408	0,305
1996	93.798	467	0,498	762.865	1.767	0,232
1997	90.779	491	0,541	780.709	1.976	0,253
1998	85.312	429	0,503	786.612	1.846	0,235
1999	78.716	328	0,417	794.875	1.647	0,207
2000	72.464	263	0,363	772.582	1.430	0,185
2001*	40.423	310	0,767	476.488	1.667	0,350
2002	65.521	358	0,546	779.573	1.260	0,162
2003	61.514	163	0,265	767.233	509	0,066
2004	57.371	98	0,171	748.916	337	0,045
2005	53.375	46	0,086	721.528	238	0,033
2006	49.850	30	0,060	695.772	96	0,014
2007	46.300	50	0,110	674.563	312	0,050
2008	42.545	27	0,060	669.498	116	0,020



En el programa de erradicación presentado en 2006, Galicia queda enmarcada en el grupo de CCAA en las que es posible la erradicación de la brucelosis para 2011 y los datos obtenidos hasta la fecha están confirmando este objetivo como una realidad.

Desde 2004 se han realizado estudios de aislamiento sobre muestras procedentes de animales positivos de todos los brotes detectados. El número total de aislamientos fue de 280. La distribución fue la siguiente: 271 cepas de *B. abortus* biovar 3 en vacuno, 2 cepas de *B. abortus* biovar 1 en vacuno, 1 cepa de RB51 en vacuno, 2 cepas de *B. mellitensis* en vacuno, 3 cepas de *B. mellitensis* en ovino y 1 cepa de *B. mellitensis* en caprino (datos propios).

### **3.4. Principales factores epidemiológicos de la brucelosis**

#### **3.4.1 Hospedadores**

La brucelosis puede afectar a una gran variedad de especies animales. Entre los animales domésticos destacan los rumiantes (bovinos, ovinos y caprinos), pero también se ha descrito en perros, cerdos y caballos. El ganado vacuno se infecta principalmente por *B. abortus*, pero cada vez son más importantes las infecciones cruzadas originadas por *B. mellitensis*, en vacunos que conviven con pequeños rumiantes (Blasco, 1994; European Communities, 2001; Luna-Martínez y Mejía-Terán, 2002; Refai, 2002). Sin embargo, no está confirmado que *B. mellitensis* pueda mantenerse indefinidamente en la población bovina en ausencia de ovino y/o caprino (European Communities, 2001). El ganado vacuno también puede estar afectado por *B. suis*. Las ovejas y las cabras se infectan con *B. mellitensis* y además las ovejas se pueden ver afectadas por *B. ovis*. El perro se afecta por *B. canis*, pero también se puede afectar con *B. abortus*, *B. mellitensis* y *B. suis* y puede constituir una seria amenaza para personas y animales. El cerdo se afecta por *B. suis*. Otras especies domésticas afectadas son el búfalo, yak, camello, dromedario y alpaca (Rodríguez y cols., 2005). La brucelosis también está descrita en una gran variedad de especies salvajes. *Brucella neotomae* es responsable de la enfermedad en la rata del desierto; *B. abortus* y *B. suis* en bisón, alce, jabalíes, liebres, zorros, búfalo africano, reno y caribú; *B. mellitensis* no suele afectar a animales salvajes, pero se ha descrito algún brote en gamuzas (*Rupicapra rupicapra*) y en ibex (*Capra ibex*) en Europa y en camellos en Oriente Próximo (Godfroid, 2002). En los últimos años también se ha descrito la enfermedad en diferentes mamíferos marinos: focas, leones marinos, delfines y ballenas (Ewalt y cols., 1994; Ross y cols., 1994; Jahans y cols., 1997; Higgins, 2000; Cloeckaert y cols., 2001). Los animales salvajes pueden ser responsables de la aparición de la enfermedad en los animales domésticos y viceversa, pero también pueden presentar ciclos propios sin ninguna relación con animales domésticos (Bathke, 1981).

### 3.4.2 Vías de eliminación y formas de contagio

Los bovinos enfermos eliminan *Brucella* spp. por las secreciones vaginales en el momento del parto o del aborto, e incluso una semana antes, en grandes cantidades y pueden seguir eliminándola hasta los 45-60 días posteriores (Sanmartino, 2006). El aborto puede provocar la excreción de  $10^{10}$  bacterias/ml (López-Merino, 2007) o  $10^{12}$  bacterias/gramo, cantidad suficiente para contagiar desde 60.000 a 600.000 novillas preñadas (Fensterbank, 1986). Esta circunstancia, entre otras, explica la enorme capacidad de *Brucella* spp. para contaminar el ambiente próximo a los animales infectados (suelos, superficies, agua, etc.) facilitando la difusión de la bacteria a otros animales y al hombre. La leche es otra de las vías de eliminación y se mantiene durante toda la lactación e incluso durante toda la vida del animal (Rodríguez y cols., 2005). La eliminación es máxima en los momentos posteriores al parto o aborto y mínima en los picos de la lactación, y aunque pueden pasar períodos largos sin eliminación ésta puede volver a producirse en cualquier momento.

En ganado vacuno infectado por *B. abortus* los animales se contaminan por contacto con otros animales después de los abortos. La contaminación de los establos, del medio ambiente próximo a los animales y de los pastos es fundamental en la diseminación de la enfermedad. La infección también se puede originar por ingestión de alimentos contaminados, inhalación de bacterias del medio ambiente, por vía conjuntival o a través de heridas en los pezones (Kerr, 1963). La transmisión de la enfermedad también se puede producir por las manos de los ganaderos o por las pezoneras de los equipos de ordeño. En animales recién nacidos es frecuente la infección a través del calostro. La transmisión sexual tiene poca importancia aunque la eliminación de bacterias a través del semen constituye una vía de contagio cuando se utiliza para inseminación artificial.

No todos los animales afectados son detectables por pruebas serológicas. Nicoletti en 1994 cita estudios en los que encontró hasta 10-15% de animales infectados que presentaban respuesta serológica negativa en el momento del parto o del aborto. Además, una parte de los animales pueden nacer infectados, pero viables, permaneciendo con una infección latente hasta la edad adulta, desarrollando la enfermedad clínica en su primera gestación. El ganado vacuno también se puede ver afectado por *B. mellitensis* y *B. suis* (mucho menos frecuente), pero es de aplicación todo lo expuesto anteriormente.

En la infección de ovejas y cabras por *B. mellitensis* se pueden hacer las mismas consideraciones que las expuestas para ganado vacuno, aunque en este caso la transmisión sexual tiene más importancia. El uso de machos compartidos, la trashumancia, la mezcla de animales de diferentes orígenes y el hacinamiento son factores epidemiológicos de especial relevancia en la brucelosis de cabras y ovejas (Corbel y cols., 2006).

La brucelosis en cerdos por *B. suis* origina abortos por medio de los cuáles se contamina el ambiente y los alimentos, constituyendo la principal fuente de contagio para el

resto de los animales. En este caso, la transmisión sexual tiene más relevancia que en los casos anteriores (Corbel y cols., 2006).

La brucelosis canina por *B. canis* es de importancia sobre todo en residencias caninas. La contaminación ambiental y la transmisión sexual son las principales vías de infección. La eliminación de *Brucella* spp. por orina puede ser una vía de transmisión de la enfermedad a personas que conviven con animales infectados, si bien el número de casos diagnosticados en humanos son muy escasos. La infección de los perros por otras especies distintas de *B. canis* generalmente está relacionada con la ingesta de abortos o envolturas fetales afectadas (Corbel y cols., 2006).

### 3.4.3 Factores de riesgo

En el ganado vacuno, pequeños rumiantes y en el cerdo los animales más susceptibles son los individuos sexualmente maduros, los jóvenes suelen ser resistentes, pero pueden presentar infecciones latentes que se manifiestan cuando alcanzan la madurez sexual.

El estado de gestación de los animales constituye un factor de riesgo de gran trascendencia ya que los abortos constituyen la principal fuente de contagio debido al elevadísimo número de bacterias eliminadas. Generalmente los animales abortan una única vez debido a la inmunidad que se desarrolla durante la infección, pero puede producirse un segundo y hasta un tercer aborto en un número no despreciable de animales. Sin embargo, estas curaciones aparentes no implican que el animal afectado no elimine bacterias, pudiendo permanecer así toda la vida y con reacciones serológicas dudosas o negativas (Plommet, 1994). El período de incubación es inversamente proporcional al estado de desarrollo fetal en el momento de la infección y puede oscilar entre los 53 y los 251 días en el ganado bovino (Nicoletti, 1994).

Otros factores que facilitan la aparición de la enfermedad son: el mayor tamaño de las explotaciones, el aumento en la incorporación de animales, el uso común de pastos y el manejo inadecuado de los partos, sobre todo en relación a la falta de desinfección de las parideras y a la eliminación inadecuada de abortos y envolturas fetales.

Según los PNE de brucelosis bovina presentados a la Comisión Europea por España (MAPA, 2006; MAPA, 2007a), los factores más destacables que justifican la prevalencia más elevada de la enfermedad en ganado vacuno en algunas zonas (Castilla La Mancha, Castilla y León, Extremadura) son: el elevado censo bovino sometido a régimen de trashumancia, las características geográficas, climáticas y sociales que condiciona el sistema de aprovechamiento de pastos comunales, y el predominio de sistemas de explotación en régimen extensivo de razas autóctonas con las dificultades de manejo inherentes a las mismas.

En la actualidad, en Galicia el número de brotes es muy escaso y su aparición está relacionada con incorporaciones de animales procedentes de explotaciones con baja

calificación sanitaria (lo más frecuente en explotaciones de leche) o con animales criados en zonas de montaña en un régimen de semilibertad y de aprovechamiento de pastos comunales (lo más frecuente en animales de carne).

## 4. Patogenia, síntomas y lesiones

### 4.1. Patogenia

*Brucella* spp. puede penetrar en el organismo por diferentes vías, siendo la más importante la oronasal, bien por la ingestión o lamido de material contaminado o por inhalación de polvo contaminado del establo. Otras vías posibles de entrada lo constituyen la congénita, la conjuntival, la percutánea (en el ordeño), la inoculación intramamaria y la intrauterina. Por tanto, la primera defensa que deben superar las bacterias son las barreras naturales de la piel y de las mucosas. Para ello, las bacterias Gram negativas presentan una membrana externa que les permite resistir la acción tóxica de sales biliares, de ácidos grasos y de glicéridos, así como de enzimas proteolíticos y glucosidasas (Blasco y Gamazo, 1994).

Una vez que la bacteria penetra en el organismo, el complemento es el siguiente mecanismo de defensa inespecífico que actúa, pero en el caso de *Brucella* spp. no está muy claro cuál es su papel. El LPS de las bacterias Gram negativas es capaz de activar el complemento por la vía alternativa lo que explicaría, en parte, el papel de contención de la infección del suero en las primeras fases de la enfermedad. Sin embargo, el LPS de *Brucella* spp. es un activador del complemento por esta vía mucho más débil que el de otras enterobacterias lo que estaría relacionado con una mayor resistencia de esta bacteria a los factores séricos (Orduña y cols., 2001b).

En las fases iniciales de la enfermedad con presencia de IgM y sin IgG, o en niveles bajos, se ha podido observar que las cepas lisas y rugosas de *B. abortus* son destruidas por el complemento activado por la vía clásica. Además, las cepas rugosas son destruidas de forma mucho más efectiva. Sin embargo, cuando a un suero con complemento se le añadían inmunoglobulinas (Ig) específicas frente al LPS-S de *Brucella* spp. de los isotipos IgG1 e IgG2 se bloqueaba la lisis bacteriana (Corbeil y cols., 1998). En consecuencia, aunque para el diagnóstico y el control de la enfermedad son fundamentales las técnicas de diagnóstico basadas en la detección de Ac, básicamente frente a la cadena O del LPS-S, todo parece indicar que los mecanismos humorales en la infección por *Brucella* spp. no tienen suficiente entidad para detenerla. Sin embargo, los Ac, junto la fracción C3b del complemento, jugarían un papel imprescindible en la opsonización de la bacteria para su posterior fagocitosis por las células del sistema inmunitario (Hoffman y Houle, 1995). Además, en experimentos realizados en ratones, se ha observado que la administración pasiva de Ig aumenta su resistencia a la enfermedad, de tal manera que los Ac son capaces de detener la infección a nivel de los ganglios poplíteos (Blasco y Gamazo, 1994).

Por tanto, el complemento se activa en las primeras fases de la infección por la vía alternativa debido a la presencia del LPS-S que actúa como activador de la fracción C3 del complemento sin necesidad de Ac. Sin embargo, cuando las concentraciones de IgG son elevadas, lo que ocurre en infecciones avanzadas, el complemento no se activa por la vía clásica y la función de las Ig sería la opsonización de las bacterias.

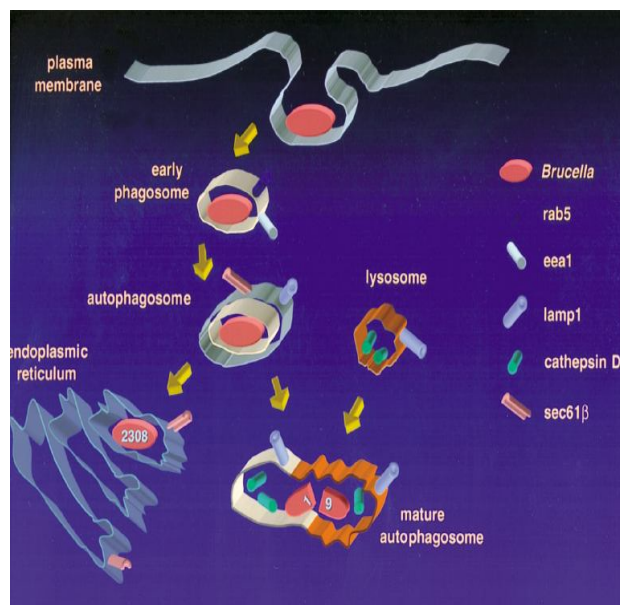
Independientemente de la vía de acceso, *B. abortus* es transportada a los ganglios linfáticos regionales más próximos al punto de entrada principalmente en el interior de macrófagos y polimorfonucleares. Estas células serán las responsables de su distribución por todo el organismo, hasta los tejidos más receptivos: bazo, ganglios linfáticos, articulaciones y los órganos reproductivos de machos y hembras. La presencia de la bacteria en estos tejidos originará la sintomatología y las lesiones características de la enfermedad.

*Brucella* spp. es capaz de sobrevivir y multiplicarse tanto en las células fagocíticas como en otras células no fagocíticas. En células fagocíticas de humanos afectados de brucelosis se estima que logran sobrevivir entre un 15-30% de las bacterias fagocitadas (Pappas y cols., 2005). La habilidad de *Brucella* spp. para persistir en las células fagocíticas explica muchas facetas de la enfermedad (Ficht, 2003).

La internalización y el tránsito de *Brucella* spp. ha sido estudiado en muchas líneas celulares de mamíferos como: fibroblastos murinos NIH3T3, células de riñón del mono verde, células Vero, HeLa (figura 7), células renales bovinas (MBDK) o de riñón de hamster (BHK). En las células no fagocíticas *Brucella* spp. se localiza en el retículo endoplásmico rugoso (RER). Este hecho ha sido puesto de manifiesto en diferentes investigaciones y con diferentes tipos de células: trofoblastos caprinos (Anderson y Cheville, 1986), células HeLa (Pizarro-Cerdá y cols., 1998a) y en células Vero (Dettileux y cols., 1990). En estos estudios se pudo observar que la bacteria penetra en la célula mediante un proceso de fagocitosis. A continuación interacciona con endosomas tempranos, siguiendo la vía endocítica, pero en las fases siguientes no llega a formarse el endosoma tardío de forma que el compartimento que contiene la bacteria tiene las características de un autofagosoma al incorporar componentes del RER y del aparato de Golgi. Al final del proceso, la bacteria se encuentra en compartimentos en el RER donde se multiplica de forma masiva. En las células fagocíticas se piensa que el proceso es semejante, de forma que la bacteria acaba multiplicándose en el RER. Sin embargo, existen estudios realizados en macrófagos murinos J774 en los que se observa que los compartimentos que contienen la *Brucella* spp. tienen las características de fagosomas de gran tamaño que están acidificados y se sugiere que se trata de verdaderos fagolisosomas en los que la bacteria se mantiene con sus características morfológicas intactas (Arenas y cols., 2000).

**Figura 7. Modelo de tránsito de *Brucella abortus* en células HeLa (Pizarro-Cerdá y cols., 2000)**

En esta figura se representa el modelo propuesto por estos autores para explicar la vía seguida por cepas de *Brucella abortus* virulentas (S2308) y atenuadas (S19) en células HeLa. Los dos tipos de bacterias se localizan en diferentes compartimentos diferenciados por marcadores de superficie. En el primero de ellos la membrana procede de la membrana plasmática (fagosoma temprano). Posteriormente se le incorpora una segunda membrana procedente del RER y proteínas LAMP procedentes posiblemente del aparato de Golgi (autofosoma). En la siguiente fase la cepa S19 no es capaz de evitar la fusión del fagosoma con el lisosoma, (fagolisosoma), y es destruida, pero la cepa S2308 si lo evita, migrando hasta el RER, en donde puede multiplicarse de forma masiva.



En las células fagocíticas *Brucella* spp. dispone de distintos mecanismos para bloquear la respuesta bactericida de estas células y/o protegerse de la acción de las sustancias antimicrobianas. Uno de los principales mecanismos de destrucción de los macrófagos lo constituyen los dependientes del oxígeno. En la fase de unión del lisosoma y el fagosoma, por acción de diferentes enzimas, se produce una gran cantidad de intermediarios del oxígeno con gran capacidad bactericida. *Brucella* spp. es capaz de producir dos tipos de enzimas que interfieren este sistema: la catalasa y la SOD. La SDO transforma el anión superóxido ( $O_2^-$ ) en  $H_2O_2$  y  $O_2$  de menor capacidad oxidativa que el primero. Posteriormente la catalasa transforma el  $H_2O_2$  en  $H_2O$  y  $O_2$  que no tienen efecto bactericida. Otro mecanismo bactericida de los macrófagos y activados por la explosión oxidativa lo constituye el sistema óxido nítrico dependiente. Tanto el sistema dependiente del oxígeno como el dependiente del óxido nítrico son activados por diferentes componentes bacterianos entre los que destaca el LPS de las enterobacterias. Sin embargo, se ha podido comprobar que el LPS de *Brucella* spp. es un inductor muy débil de estos sistemas lo que facilitaría su supervivencia en el interior de los macrófagos (Orduña y cols., 2001a).

Otro mecanismo de defensa de *Brucella* spp. estaría relacionado con la producción de proteínas de estrés térmico como respuesta al ambiente increíblemente hostil de los macrófagos caracterizado por un pH muy bajo, por la falta de nutrientes y por la presencia de los sistemas de defensa dependientes del oxígeno y del óxido nítrico. En estas circunstancias, se ha podido observar que *Brucella* spp. es capaz de producir una serie de proteínas con pesos moleculares entre 17 y 62 kDa, entre las que se encuentran las GroEL (60 kDa), GroES (10 kDa) y HtrA (60

kDa), que serían responsables de diferentes actividades relacionadas con la supervivencia de la bacteria (López-Merino, 2007; Orduña y cols., 2001a, Rivers y cols., 2006).

También se ha propuesto que la supervivencia de la *Brucella* spp. en el interior de los linfocitos estaría relacionada con la producción de 5' guanosina monofosfato y adenina. La presencia de estas sustancias estaría relacionada con la inhibición de la fusión del lisosoma con el fagolisosoma, la degranulación y la producción del factor de necrosis tumoral (TNF). También actuarían incrementando la producción de SOD (López-Merino, 2007).

La supervivencia de *Brucella* spp. en el interior de los macrófagos también parece guardar relación con la fagocitosis de bacterias opsonizadas o no. De esta forma, se ha podido observar como la fagocitosis de bacterias no opsonizadas no desencadenan la activación de los sistemas de defensa dependientes del oxígeno. La fagocitosis de bacterias no opsonizadas también se ha relacionado con la capacidad de prevenir la fusión del fagosoma con el lisosoma permitiendo la supervivencia de la bacteria en el interior de los macrófagos (Splitter, 2007).

Los macrófagos actúan como células presentadoras de Ag procedentes de las *Brucellas* spp. fagocitadas y destruidas. Estos Ag son los responsables de la sensibilización de los T CD4+ que al diferenciarse por la vía Th1 determina una respuesta inmunitaria de tipo celular, en los tejidos afectados, que se manifiesta en forma de reacciones inflamatorias crónicas de carácter granulomatoso características de la hipersensibilidad de tipo retardado.

La brucelosis en rumiantes puede presentarse de forma latente, aguda o crónica (Ficht, 2003). En la brucelosis aguda se produce una rápida colonización de las células de la placenta. Este hecho parece guardar relación con la presentación de una inmunosupresión localizada y con los cambios hormonales debidos a la gestación. El crecimiento descontrolado en estos tejidos origina una necrosis de la placenta con la aparición de abortos o de nacidos poco viable (Ficht, 2003). En las hembras, la afinidad de la bacteria por los órganos reproductivos también guarda relación con la producción de un compuesto natural en el útero, el eritritol (Nicoletti, 1994).

En la brucelosis crónica *Brucella* spp. persiste en los nódulos linfáticos supramamarios y del bazo, siendo eliminada a través de la ubre por la leche. Los animales pueden permanecer excretores durante mucho tiempo y algunos durante toda su vida (Ficht, 2003).

La brucelosis latente se produce en algunos animales nacidos de vacas positivas que se infectan "in utero" o en los primeros días de vida a través del calostro. La infección persiste durante toda la vida y mantienen una serología negativa generalmente hasta el primer parto o aborto (Lapraik, 1982; Fensterbank, 1986; Nicoletti, 1994; Ficht, 2003). El número de animales que pueden presentar esta situación es pequeño. Varía entre el 2% y el 5% según los autores. El fenómeno de latencia también está documentado en los ovinos (Barberán y Blasco, 2002; Corbel y cols., 2006).

## **4.2. Síntomas y lesiones**

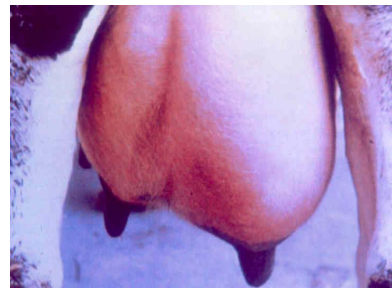
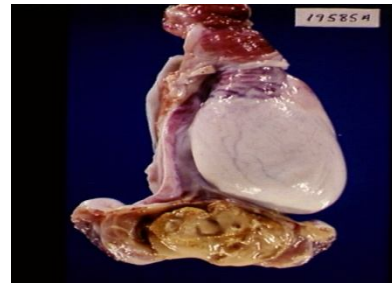
Los síntomas y lesiones originados por *Brucella* spp. en bovino están relacionados con la patogenia de la bacteria y con el tipo de tejido afectado.

En la brucelosis aguda el síntoma más típico es el aborto en el último tercio de la gestación. También se puede producir el nacimiento de animales prematuros o si las gestaciones llegan a término los animales son poco viables. En los partos siguientes a la infección los nacidos suelen ser viables. Cuando se produce la entrada de la bacteria en una explotación, se produce la diseminación de los abortos a saltos, es decir, los animales próximos a los enfermos no se infectan resultando afectados otros más alejados (Bathke, 1981).

Los fetos abortados se presentan edematosos, con autólisis, con los órganos hemorrágicos y con focos necróticos. Es muy frecuente la presencia de bronconeumonías. Las placentas después de los abortos están engrosadas, edematosas y hemorrágicas, los cotiledones presentan fibrina y pueden presentar pus. Generalmente se produce retención de secundinas y metritis. Después del aborto el animal elimina un exudado vaginal turbio, grumoso y con sangre (Nicoletti, 1994).

También puede afectar a las articulaciones originando artritis o poliartritis y a las serosas originando inflamaciones en cuello o rodillas. Los órganos internos más afectados son el hígado y el bazo en los que origina inflamaciones crónicas de carácter granulomatoso. En los machos puede originar epididimitis y orquitis con infertilidad temporal, pudiéndose eliminar *Brucella* spp. por el semen (Nicoletti, 1994).

**Figura 8. Imágenes de lesiones típicas de *Brucella* spp. (Bovis, 1986; The Center Food Security and Public Health)**





## 5. La respuesta inmunitaria frente a *Brucella abortus*

### 5.1. Inmunidad de base celular

La inmunidad frente a *Brucella* spp. ha sido estudiada básicamente en el modelo murino. Sin embargo, a medida que avanza su conocimiento en el bovino gracias al desarrollo de los Mab, de las técnicas genéticas como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la caracterización de genes productores de citoquinas, se ha observado un importante paralelismo entre ambas especies que permite extrapolar muchos de los mecanismos de inmunidad murina al bovino (Wyckoff, 2002).

La inmunidad en bovino frente a *Brucella* spp. implica a la inmunidad innata y a la adaptativa con la participación de macrófagos, células de citotoxicidad natural (NK), los linfocitos T cooperadores (T CD4<sup>+</sup>), los linfocitos T citotóxicos (T CD8<sup>+</sup>), los linfocitos B y las citoquinas (Golding y cols., 2001; Wyckoff, 2002).

En las fases iniciales de la infección las células implicadas en la inmunidad de base celular son los polimorfonucleares neutrófilos (PMN), los macrófagos y las células NK, todas ellas tienen capacidad fagocítica y son responsables de la inmunidad natural. Estos tres tipos de células van a fagocitar a *Brucella* spp. cuando penetra en el interior de los animales. Por un lado, las células NK actúan matando células infectadas y produciendo gamma interferón (IFN-γ). Y por otro, los PMN y los macrófagos van a fagocitar y destruir a *Brucella* spp., pero también van a ser las células encargadas de transportarla hasta los ganglios linfáticos regionales más próximos y al bazo, en donde se desarrollará la respuesta inmunitaria específica o adaptativa.

En la inmunidad adaptativa participan activamente los macrófagos como células presentadoras de Ag y productoras de citoquinas, los T CD4<sup>+</sup>, los T CD8<sup>+</sup> y los linfocitos B responsables de la respuesta humoral.

Las bacterias intracelulares activan a los macrófagos para la producción de IL12, que también son estimulados por el LPS-S de *Brucella* spp. (Corbel, 1997).

La respuesta adaptativa se inicia al 4º o 5º día postinfección cuando los mecanismos naturales no han sido suficientes. En esta fase, los macrófagos expresan en su superficie determinados péptidos procedentes de la fagocitosis de *Brucella* spp. que serán reconocidos por los T CD4<sup>+</sup> específicos en los órganos linfoides periféricos. Estos linfocitos se podrán diferenciar en células Th1 o Th2 en función del entorno particular de citoquinas presentes durante las primeras fases de su activación y proliferación. La citoquina IL12 producida por los macrófagos y el IFN-γ producido por las células NK estimulan la diferenciación por la vía Th1 (Golding y cols., 2002).

El modelo general de inmunidad adaptativa de base celular, en el bovino, frente a *Brucella* spp. se representa en la figura 9. Las principales células implicadas son los macrófagos, los T CD4<sup>+</sup> y los T CD8<sup>+</sup>. Las células NK producen IFN-γ que estimula la fagocitosis y la producción

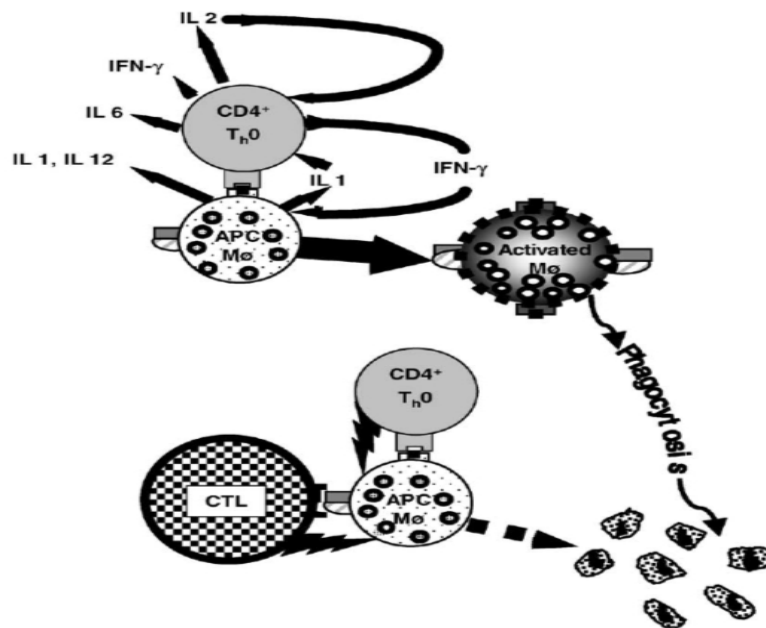
de IL-12 por los macrófagos. Estas últimas células también son estimuladas por el LPS-S de *Brucella* spp. para la producción de la IL-12 (Corbel, 1997). Como consecuencia de la fagocitosis los macrófagos también producen IL-1 cuya función es estimular la aparición de receptores para la IL-2 en los linfocitos. Además, producen TNF- $\alpha$  con efectos sobre las células endoteliales de los vasos sanguíneos modificando su permeabilidad. Los péptidos procedentes de la fagocitosis y posterior destrucción de algunas bacterias son expresados a través de los receptores de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de los macrófagos. Estos péptidos son reconocidos por los T CD4<sup>+</sup> específicos. El ambiente de citoquinas rico en IL12 e IFN- $\gamma$  estimula la diferenciación de los T CD4<sup>+</sup> por la vía Th1. Los T CD4<sup>+</sup> activados producirán nuevas cantidades importantes de IFN- $\gamma$  que a su vez actuará estimulando la actividad fagocítica de otros macrófagos y de células NK, además de la diferenciación de otros T CD4<sup>+</sup> por la vía Th1. También van a producir IL2 que actuará sobre macrófagos y células NK y activará a otros linfocitos. Cuando un macrófago infectado interacciona con un T CD4<sup>+</sup> diferenciado y con un T CD8<sup>+</sup> se desencadena la transformación de este último en una célula T citotóxica que será capaz de destruir cualquier célula infectada que presente Ag específicos en su superficie asociados a moléculas del MHC (Wyckoff, 2002).

Los T DC4<sup>+</sup> reconocen los péptidos presentados por los macrófagos a través de los receptores de clase II del MHC. Sin embargo, los T CD8<sup>+</sup> reconocen los Ag presentados por los macrófagos unidos a los receptores de clase I del MHC. En general, se acepta que los Ag que penetran en el interior de los macrófagos por fagocitosis son presentados al exterior a través de los receptores de clase II, constituyendo la vía exógena. Por el contrario, los Ag sintetizados en el citoplasma de los macrófagos se expresan a través de los receptores de clase I del MHC, constituyendo la vía endógena (Wyckoff, 2002).

La respuesta celular contra *Brucella* spp. es responsable de las reacciones de hipersensibilidad retardada que son la base del diagnóstico de la enfermedad mediante la brucelina. En este tipo de respuesta se produce una fase inicial de sensibilización que no produce síntomas y una fase efectora durante el contacto secundario, que sí presenta síntomas y que tiene por objetivo eliminar al patógeno. En la fase de sensibilización se producen T CD4<sup>+</sup> activados por macrófagos. Estos linfocitos dan lugar a linfocitos de memoria que recirculan constantemente por todo el organismo. En la fase efectora, los linfocitos de memoria contactan nuevamente con el Ag a través de los macrófagos originando la liberación de citoquinas responsables del desencadenamiento de una reacción inflamatoria localizada. A su vez, esta reacción inflamatoria y las propias citoquinas estimulan la llegada y la activación de más macrófagos y de otras células inflamatorias que amplifican la respuesta (Díaz y Blasco, 1994; OIE, 2006a; Tizard, 2009).

Finalmente destacar que en la actualidad está perfectamente demostrada la existencia de una regulación cruzada entre Th1 y Th2. El IFN- $\gamma$  secretado por las Th1 inhibe la proliferación de las Th2; la IL-10 secretada por las Th2 inhibe la secreción de IL-2 y IFN- $\gamma$  por parte de las Th1 (Wyckoff, 2002).

Figura 9. Modelo de defensa frente a brucelosis en bovino (Wyckoff, 2002)



*CD4<sup>+</sup> T<sub>h</sub>0: linfocitos T cooperadores sin diferenciar*

*CTL: linfocitos T citotóxicos (CD8<sup>+</sup>)*

*APC Mo: células presentadoras de Ag, generalmente macrófagos*

## 5.2. Inmunidad de base humoral

En líneas generales, la información incluida en este apartado se obtuvo de Tizard (2009) y del curso Introducción a la inmunología porcina (Sánchez-Vizcaíno, 2009). Los Ac son moléculas de naturaleza proteica, con una estructura compleja y producidos por los linfocitos B, siendo los responsables de la inmunidad de base humoral. En el control de la brucelosis juegan un papel secundario o subordinado, pero no por ello significa que no actúen. La detección de estas moléculas en el suero de animales es el procedimiento más utilizado para el diagnóstico de la brucelosis bovina, principalmente por la facilidad de aplicación y los buenos resultados de sensibilidad (Se) y de especificidad (Sp) de las técnicas diagnósticas utilizadas para su detección.

### 5.2.1. Estructura básica de las inmunoglobulinas

La estructura básica de las Ig así como las estructuras responsables de su actividad funcional y de sus propiedades biológicas se esquematizan en las figuras 10 y 11. Los Ac están formados por dos cadenas pesadas (H) y dos ligeras (L). Las cuatro cadenas se mantienen unidas entre sí por enlaces covalentes y puentes disulfuro, formando una estructura en forma de Y. Las diferentes clases de Ig se presentan bien como monómeros

de la unidad básica (IgG, IgD, IgE), como pentámeros (IgM) o como monómero, dímero o trímero (IgA).

Tanto las cadenas pesadas como las ligeras están constituidas por series cortas de aminoácidos plegados de forma globular que constituyen los dominios de las Ig. Estos dominios suelen mantenerse “cerrados” mediante puentes disulfuro (S-S). Las cadenas ligeras están formadas por dos dominios y las pesadas por cuatro o cinco dominios. Los dominios del extremo aminoterminal de ambas cadenas presentan una composición de aminoácidos variable y se denominan región variable ( $V_L$  en la cadena ligera y  $V_H$  en la cadena pesada). En la parte opuesta de ambas cadenas se encuentra el extremo carboxiterminal que presenta una composición constante de aminoácidos y se denomina región constante ( $C_L$  en la cadena ligera y  $C_H$  en la cadena pesada). La región constante de la cadena pesada está constituida por tres dominios (IgA e IgG) o cuatro dominios (IgM e IgE) a diferencia de la región constante de la cadena ligera que está constituida por un único dominio. A su vez, las regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas constan de dos tipos de secuencias de aminoácidos: unos más o menos constantes que se denominan regiones armazón y otros hipervariables denominados regiones determinantes de complementariedad que constituyen las zonas de unión a los Ag.

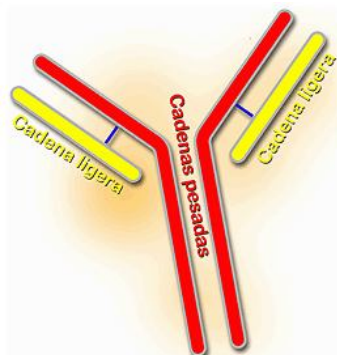
De la escisión enzimática con papaína de una molécula básica de Ig se obtienen tres fragmentos: 2 iguales denominados Fab y uno denominado Fc. Los fragmentos Fab están formados por cada uno de los dos brazos de la Y y contiene la zona de reconocimiento y de unión al Ag. El fragmento Fc contiene los dominios apareados de ambas cadenas pesadas especializados para desencadenar determinadas funciones biológicas como son: la activación de la cascada del complemento, la transferencia placentaria de algunas Ig, la citotoxicidad celular mediada por Ac o la opsonización. Además, el fragmento Fc incluye la zona de unión del Ac a la membrana del linfocito B.

Sólo existen dos tipos de cadenas ligeras: kappa ( $\kappa$ ) y lambda ( $\lambda$ ). Son comunes a todas las clases de Ig. Cada clase puede tener cadenas ligeras de tipo  $\kappa$  o de tipo  $\lambda$ , pero ambas iguales en una misma molécula. Sin embargo, existen cinco tipos de cadenas pesadas:  $\gamma$ ,  $\alpha$ ,  $\mu$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$  y cada una de ellas corresponde a una clase de Ig: IgG ( $\gamma$ ), IgA ( $\alpha$ ), IgM ( $\mu$ ), IgD ( $\delta$ ) y IgE ( $\epsilon$ ).

Los linfocitos B se encuentran recubiertos de cientos de miles de receptores de Ag idénticos para cada uno de ellos. Estos receptores son los encargados de fijar los Ag a la superficie de los linfocitos para que sean transformados y se pueden expresar los fragmentos peptídicos correspondientes a través de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II, pero además, estos receptores se pueden liberar de la superficie de los linfocitos B a los líquidos del organismo constituyendo los Ac. Por tanto, los Ac constituyen formas solubles de los receptores de Ag de los linfocitos B.

**Figura 10. Esquemas de la estructura responsable de la actividad funcional y de las propiedades biológicas de las inmunoglobulinas**

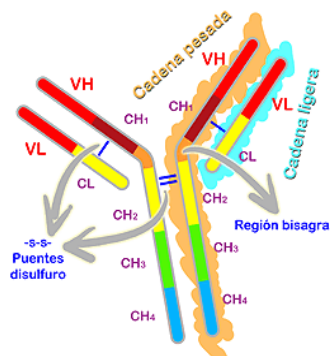
Curso de introducción a la inmunología porcina (Sánchez- Vizcaino, 2009): <http://www.sanidadanimal.info/cursos/inmuno2/ca041.htm>



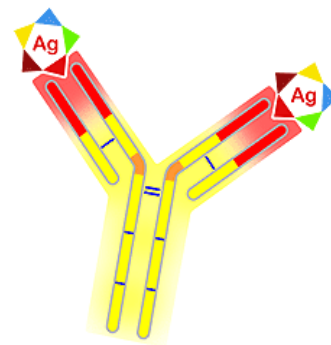
*Imagen A: Estructura básica de las inmunoglobulinas*



*Imagen B: Efecto de las proteasas sobre las inmunoglobulinas*



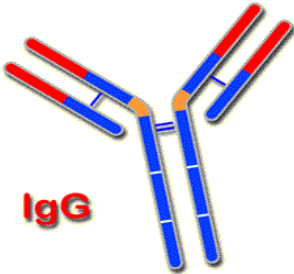
*Imagen C: Dominios de las inmunoglobulinas*



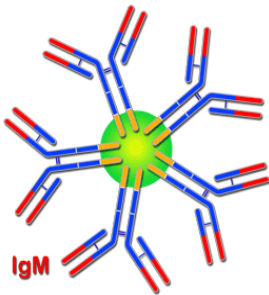
*Imagen D: Localización de los sitios de unión con el Ag*

**Figura 11. Estructura y funciones de las inmunoglobulinas**

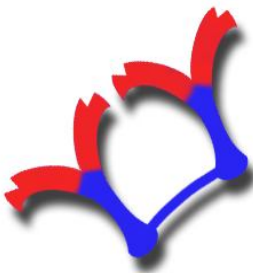
**Fuente del texto:** Inmunología Veterinaria. Quinta edición, Interamericana McGraw-Hill. (Tizard, 2009)



**IgG:** Se produce principalmente en el bazo, ganglios linfáticos y médula ósea. Tiene un peso molecular de 180 kDa y está formada por dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras también idénticas  $\kappa$  ó  $\lambda$ . Por su pequeño tamaño puede emigrar fácilmente a los líquidos hísticos y a la superficie de los órganos. Tiene una gran afinidad por los Ag y puede aglutinar, precipitar y opsonizar a los Ag facilitando la fagocitosis. Sin embargo, sólo activará al complemento por la vía clásica si el Ag presenta en su superficie una cantidad suficiente de esta inmunoglobulina y en una determinada configuración (por lo menos, dos moléculas lo suficientemente juntas para permitir la unión de la fracción C1 del complemento). Su concentración sérica en bovino oscila entre 1.700-2.700 mg/100 ml y es la más abundante.



**IgM:** Se produce principalmente en el bazo, ganglios linfáticos y médula ósea. Tiene un peso molecular de 900 kDa. Cuando actúa de BCR en linfocitos es un monómero de un tamaño similar a la IgG, pero cuando se secreta aparece en forma de polímero con 5 unidades básicas unidas por un polipéptido denominado cadena J. La unidad básica es similar a una IgG, pero a diferencia de ésta, su cadena pesada consta de 4 dominios constantes y no tiene región bisagra. Las cadenas ligeras son similares a las de la IgG. Es la más importante en la respuesta primaria y debido a su gran tamaño se encuentra en el torrente circulatorio. Es mucho más eficiente que la IgG en la activación del complemento por la vía clásica (basta una sólo molécula para activarlo), en la aglutinación y en la opsonización a pesar de tener una menor afinidad por los Ag que ésta. Su concentración sérica en bovino oscila entre 250-400 mg/100 ml.



**IgA:** Se produce principalmente en las vías respiratorias e intestinales. Cada unidad básica tiene un peso molecular de 150 kDa, pero se secreta generalmente en forma de dímeros. Su concentración en el suero bovino suele ser entre 10-50 mgr/ml. La unidad básica tiene una estructura similar a la IgG. En la forma dimérica, las unidades básicas aparecen unidas por una cadena J. Son producidos a nivel de las mucosas (saliva, líquido intestinal, secreciones nasales y traqueales, lágrimas, leche, calostro, orina y secreciones de las vías urogenitales) y secretadas a la luz intestinal en grandes cantidades, pero también pueden aparecer en el torrente circulatorio. Para ser secretada se une a un receptor de naturaleza proteica que la protege de la digestión por las proteasas intestinales. No tiene capacidad para activar al complemento por la vía clásica, ni actúa como opsonina, pero tiene una buena capacidad de aglutinación, aunque su principal función es evitar la adherencia de los Ag a las paredes de las mucosas. También puede unirse al Ag en los tejidos o en el interior de los enterocitos y, en ambos casos, los complejos formados serán expulsados a la luz intestinal. Una parte de la IgA puede pasar al torrente circulatorio y ser eliminada a la luz intestinal a través de los hepatocitos del hígado, vía muy importante en los pollos, conejo y rata (30-75%) y de poca importancia en los mamíferos (<5%). En lo bovinos se concentran principalmente en el calostro (400 mgr/100 ml), las lágrimas (260 mgr/100ml), las secreciones nasales (200 mgr/100ml), la saliva (56 mgr/100ml), el suero (30 mgr/100ml) y la leche (10 mgr/100ml).

Fuente de las imágenes: Curso de introducción a la inmunología porcina (Sánchez- Vizcaino, 2009).  
<http://www.sanidadanimal.info/cursos/inmuno2/ca041.htm>

### 5.2.2. Principales tipos de inmunoglobulinas

Las Ig más importantes así como sus principales características, su estructura esquematizada y sus funciones básicas se indican en la figura 11. Las principales clases y subclases de Ig en algunas especies domésticas se incluyen en la tabla 6.

Las Ig se dividen en cinco clases en función del tipo de cadena pesada que posean. La IgG es la más abundante en suero de mamíferos, la segunda es la IgM, la tercera es la IgA, si bien esta es la predominante en secreciones como la saliva, la leche o el líquido intestinal. La IgD no existe en todos los mamíferos y la IgE tiene una concentración baja en suero actuando como mediadora de las reacciones alérgicas.

Tabla 6. Principales isotipos de inmunoglobulinas presentes en algunas especies animales. (Tizard, 2009)

Isotipos o clases						
Especie		IgG	IgA	IgM	IgE	IgD
Caballo	Subclases	G1, G2, G3, G4, G5, G6, G7	A	M	E	D
Vaca		G1, G2, G3	A	M	E	D
Oveja		G1, G2, G3	A1, A2	M	E	D
Cerdo		G1, G2a, G2b, G3, G4	A	M	E	D

El estudio de la variabilidad genética de las Ig con Mab ha permitido diferenciar tres tipos de variantes: variantes isotípicas, variantes alotípicas y variantes idiotípicas. Las variantes isotípicas están codificadas por genes que se encuentran en la misma especie animal, por lo que este tipo de Ig estará presente en todos los miembros de la especie. Los anti-Ac utilizados para diferenciar estas variantes se obtienen por inmunización de individuos de una especie diferente. Las partes de la molécula que reaccionan con esos anti-Ac se encuentran en las regiones constantes de las cadenas pesadas. Por tanto, estas variantes darán lugar a las diferentes clases de Ig. Ahora bien, estas clases pueden a su vez subdividirse en subclases, lo que implica diferencias antigénicas y, generalmente, actividades biológicas diferentes (tabla 6). Las variantes alotípicas se encuentran en las Ig de algunos individuos de una especie y se expresan en las regiones constantes de las cadenas pesadas y ligeras. Se ponen de manifiesto al inocular Ig de un animal a otro de la misma especie. Finalmente, las variantes idiotípicas se pueden encontrar en un individuo o en varios de la misma especie dependiendo de si estuvieron en contacto o no con un mismo Ag. Estas variantes se localizan en las regiones hipervariables de las cadenas ligeras y

pesadas de las Ig y afectan a las secuencias de aminoácidos de estos dominios (Tizard, 2009).

### 5.2.3. La respuesta inmunitaria productora de anticuerpos

Las células implicadas en la producción de Ac son los linfocitos B, los T CD4<sup>+</sup> y las células presentadoras de Ag (macrófagos y células dendríticas).

Los linfocitos B actúan produciendo Ac en presencia de T CD4<sup>+</sup> diferenciados por la vía Th2, pero también actúan como células presentadoras de Ag igual que los macrófagos y las células dendríticas. Los linfocitos B se pueden activar por dos vías. La primera se basa en la capacidad que tienen los receptores de superficie de los linfocitos B de reaccionar directamente con el Ag en su forma nativa (Ag libre no unido a células presentadoras de Ag) que una vez fijado es internalizado y fragmentado sin fagocitosis. Los fragmentos obtenidos se externalizan a través de los Ag de clase II del MHC para que sean reconocidos por algún T CD4<sup>+</sup>. Este linfocito en presencia de IL4, principalmente, se va a diferenciar por la vía Th2 originando la transformación del linfocito B en una célula plasmática productora de Ac. La segunda vía de activación de los linfocitos B se origina a partir de las células presentadoras de Ag, principalmente los macrófagos. Es un proceso inespecífico, pero más eficaz que el anterior ya que estas células fagocitan todo tipo de partículas y no solo Ag específicos. En este caso, los macrófagos fagocitan al Ag, degradándolo en el interior de los lisosomas. Posteriormente, los fragmentos son transportados al exterior y presentados a través de los Ag de clase II del MHC. Los Ag presentados serán reconocidos por un T CD4<sup>+</sup>, activándose ambas con proliferación de celular, aumento del número de receptores específicos y producción de IL1 por los macrófagos y de IL4 por los linfocitos. Los T CD4<sup>+</sup> se diferencian por la vía Th2 y al entrar en contacto con un linfocito B específico originan su transformación en una célula plasmática productora de Ac. Existe una tercera vía de activación de los linfocitos B que es la desencadenada por los Ag T independientes sin necesidad de participación de células presentadoras de Ag. Una de las sustancias principales capaz de activar esta vía es el LPS de *Brucella* spp. Sin embargo, el LPS no es capaz de originar una respuesta de hipersensibilidad de tipo retardado como ocurre con las proteínas (Tizard, 2009).

Independientemente de la vía de activación de los linfocitos B, una parte de ellos van a permanecer como linfocitos de memoria, de larga duración, responsables de la respuesta secundaria de los animales que han estado en contacto previo con un Ag determinado.

### 5.2.4. Tipos de respuesta y actividad de los anticuerpos frente a *Brucella* spp.

En la respuesta humoral se pueden distinguir dos grandes fases: la fase inductora o respuesta primaria y la fase efectora o respuesta secundaria. Las características de estas

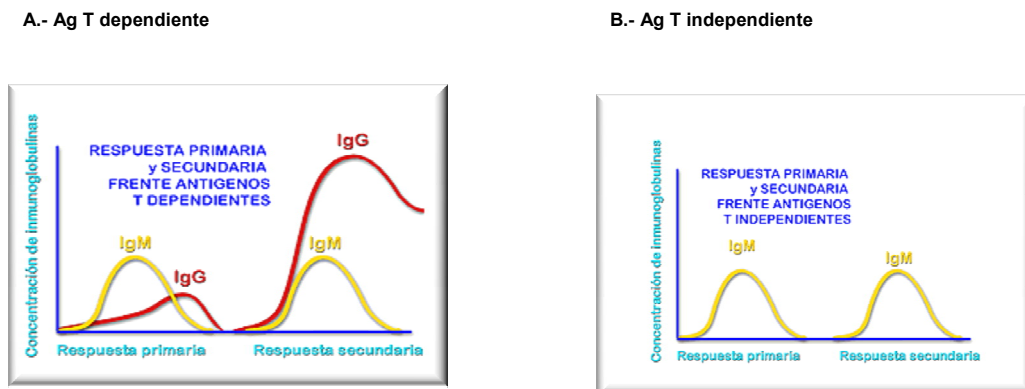


dos fases son diferentes en función de las características del Ag, pero presentan similitudes. Independientemente del tipo de Ag, la respuesta primaria se produce en el bazo y en los ganglios linfáticos y es la responsable de la aparición de los linfocitos de memoria. La respuesta secundaria se produce principalmente en la médula ósea, aunque también están implicados los ganglios linfáticos y el bazo.

Con los Ag T dependientes (figura 12B), la respuesta primaria es más lenta, origina títulos bajos y de corta duración tanto de IgM como de IgG, pero siendo mayores los niveles de la primera. En la respuesta secundaria predominan las IgG sobre las IgM. Los niveles de éstas últimas se mantienen similares a los de la respuesta primaria, pero los niveles de IgG son mucho más altos que en la respuesta primaria y muy superiores a los obtenidos para la IgM. En esta fase la aparición de Ac es más rápida y su permanencia es de más larga duración.

La respuesta humoral con los Ag T independientes (figura 12A) se diferencia de la anterior en que los tipos de Ac producidos en ambas fases son IgM y los niveles alcanzados también son similares en ambas respuestas.

**Figura 12. Modelo propuesto de respuesta primaria y secundaria**



Fuente de las imágenes: Curso de introducción a la inmunología porcina (Sánchez-Vizcaino, 2009).  
<http://www.sanidadanimal.info/cursos/inmuno2/ca041.htm>

En la tabla 7 se muestran algunas de las propiedades más relevantes de las Ig del ganado vacuno. En la infección por *Brucella* spp. se ha observado la participación de cuatro clases y subclases de Ig: IgG1, IgG2, IgM e IgA (Nielsen y Duncan, 1987; Sutherland y Searson, 1990). Los test de diagnóstico que se utilizan en el control de la brucelosis están condicionados por la avidéz de las Ig por los diferentes epítomos con los que reaccionan y por el momento de su aparición en el curso de la infección. Los principales Ag de *Brucella* spp. contra los que se desencadena la respuesta inmunitaria se encuentran en la membrana externa. El más importante de todos ellos es la cadena O del LPS que es el componente más abundante, el más externo y el primero que entra en contacto con el sistema inmunitario. De igual forma, está totalmente demostrada la capacidad como Ag del

lipopolisacárido rugoso (LPS-R) y de otras estructuras más profundas de la membrana como el lípido A (Rojas y cols., 2001). Además, también se ha demostrado la capacidad antigénica de las proteínas de la membrana externa, de algunos componentes citosólicos y del NH. Para este último componente se ha podido observar su capacidad para diferenciar animales vacunados de animales con infecciones de campo, por técnicas de precipitación en gel debido a la distinta afinidad de los Ac producidos en un caso o en el otro. El NH puede desencadenar diferentes respuestas según que los Ac tengan su origen en la vacunación con B19 o procedan de infecciones de campo. De esta forma, las terneras inmunizadas antes de los 6 meses con esta vacuna no desarrollan Ac detectables a los test de precipitación en gel o desaparecen antes de la edad adulta, fenómeno que no sucede con las infecciones de campo que sí originan niveles detectables (Blasco, 1994).

El tipo y los niveles de Ig producidos durante la infección por *Brucella* spp. se han estudiado básicamente, mediante la respuesta a la vacunación, la respuesta a las infecciones experimentales de los animales con cepas patógenas y al estudio de animales con infecciones de campo. Los primeros Ac en aparecer frente al LPS con una cepa viva de B19 son las IgM hacia los 5 días, alcanzado el pico a los 13 días postvacunación. La IgG1 aparece al mismo tiempo que la IgM o un poco más tarde, hasta los 14 días, para alcanzar el pico entre los 28 y los 42 días. A partir de esta fecha empieza a descender. Este patrón se mantiene similar para las infecciones experimentales con cepas patógenas y para las infecciones de campo, con la salvedad de que en estas dos últimas los niveles de IgM son más bajos que en los casos de vacunaciones y los niveles de IgG1, de IgG2 y de IgA son más elevados y persistentes en el tiempo (McMillan, 1990), pero también se ha detectado que la Ig predominante es la IgG1 (Sutherland y Searson, 1990). Este diferente comportamiento de los Ac entre las vacunaciones y las infecciones de campo se ha utilizado para el diagnóstico diferencial de ambos grupos de animales. Efectivamente, cuando los animales son vacunados con B19, entre los 3 y los 6 meses de edad, los niveles de Ac decrecen rápidamente, de forma que a partir de los seis meses no se detecta IgG2 y los niveles de IgM y de IgG1 son muy bajos. Sin embargo, en los animales con infecciones de campo, después de los 6 meses, los niveles de IgG1 y de IgG2 son elevados y se mantienen en el tiempo (Díaz y Blasco, 1994).

**Tabla 7. Propiedades más importantes de las principales clases de inmunoglobulinas implicadas en la inmunidad de tipo humoral en ganado vacuno**

Propiedad	Clases de inmunoglobulinas		
	IgM	IgG	IgA
Tiempo aparición en días	Entre 5 y 7	Entre 14 y 21	-
Tiempo hasta título máximo días	Entre 13 y 21	Entre 28 y 41	-
Localización predominante	Calostro y suero	Calostro y suero	En gran cantidad en el intestino, superficie de las mucosas y en líquidos biológicos (líquido cefalorraquídeo, secreción bronquial, lágrimas, saliva, etc). Importante en calostro
Contenido aproximado en suero (mgr/100 ml) (*)	Entre 250 y 400	Entre 1.700 y 2.700	Entre 10 y 50
Contenido aproximado en leche (mgr/100 ml)	Entre 10 y 20	Entre 50 y 750, predominando la IgG1	Entre 10 y 50
Origen de cada clase en la leche	Se produce localmente en la ubre	El 30% procede del suero. El resto se produce localmente en la ubre	El 10% procede del suero. El resto se produce localmente en la ubre
Contenido aproximado en calostro (mgr/100 ml)	Entre 300 y 1.300	Entre 2.400 y 8.000. La mayor parte es la subclase IgG1	Entre 100 y 700
Origen de cada clase en calostro	La mayor parte procede del suero	Toda procede del suero	Cerca del 50% procede del suero
Capacidad aglutinante	SI	SI	SI
Capacidad neutralizante	SI	SI	SI
Capacidad precipitante	SI	SI	SI
Fijar complemento	SI	SI	Si, pero sólo por la vía alternativa
Opsonización	SI	SI	SI
Atraviesa membranas biológicas	No, generalmente localizada en espacios intravasculares debido a su gran tamaño. Llega al neonato a través del calostro	Si, pero en esta especie no puede atravesar la placenta, llega al neonato a través del calostro. Debido a su pequeño tamaño, es la más abundante en los tejidos	No, pero es secretada por las mucosas. Llega al neonato a través del calostro
Ig detectadas por la AMRB	SI	SI (IgG1)	NO
Ig detectadas por la FC	SI (menos importantes)	IgG1 IgG2, débilmente, es la responsable de los fenómenos de zona	NO
Ig detectadas por el Ring Test	SI	SI (menor importancia que IgM)	SI (siempre y el más importante)
Ig detectadas por el ELISAI (según el conjugado utilizado)	Conjugado utilizado en algunos ensayos	IgG1, es el conjugado usado principalmente	NO
Ig detectadas por el ELISAc	SI	SI	SI
(*) Puede presentar diferencias estacionales muy importantes			

Fuente: Blasco (1994), MacMillan (1990), Sutra y cols. (1986) y Tizard (2009)

Las Ig tienen avidez diferente por los Ag de *Brucella* spp. Así se ha observado que la IgG1 e IgG2 tienen especial avidez por los epítomos de la cadena O del LPS, mientras que la IgM parece tener mayor avidez por los epítomos del Lípido A y del LPS-R (Rojas y cols., 1994).

En la tabla 7 se puede observar las principales Ig implicadas en el diagnóstico serológico. La IgM es detectada por la AMRB, la FC y el ring test. La IgG1 es detectada por la AMRB y la FC. La IgA es la detectada principalmente por el ring test. Los test de ELISA pueden detectar los tres isotipos, aunque en el caso del ELISAI dependerá del conjugado utilizado y la mayoría de los test utilizan uno frente a la IgG1, debido a que es la Ig predominante en las infecciones de campo en relación a la IgG2 y a la IgA (Nielsen, 2002).

La IgM se mantiene en niveles más elevados en animales vacunados que en animales con infección natural a lo largo del tiempo (Corbel, 1972). Esta Ig tiene capacidad para aglutinar y para fijar el complemento, aunque existen estudios en los que se observa que no es capaz de fijar el de cobaya (Nielsen y Duncan, 1987). Las aglutinaciones originadas por esta Ig no permiten diferenciar animales infectados de animales vacunados, ni animales en el origen de la infección de animales en las etapas tardías después de la vacunación (Lamb y cols., 1979). También está implicada en la aparición de reacciones falsas positivas con los test de aglutinación. El origen de estas reacciones está relacionado con la existencia de Ac procedentes de microorganismos próximos estructuralmente o con la presencia de otros Ac aglutinantes no específicos, presentes en el suero de algunos animales, que producen la aglutinación de células de *Brucella* spp. a través de la fracción Fc y no de la Fab (MacMillan, 1990). Una forma de reducir el número de estas reacciones inespecíficas se consigue mediante la acidificación del medio, hecho que se utiliza en la AMRB, en la que la suspensión de bacterias se realiza a un pH de 3,6 (OIE, 2004).

La fracción de IgG está compuesta por la IgG1 y la IgG2. La primera es la más importante para el diagnóstico de la brucelosis. Es la Ig más importante en animales con infecciones de campo. En estos casos, sus niveles se mantienen elevados en el tiempo a diferencia de lo que ocurre en los vacunados, en los que a partir de los seis meses esta Ig tiene una actividad muy baja (Blasco, 1994). Su producción es primera que la IgG2 y alcanza niveles más elevados que ésta en los animales infectados. La IgG1 es la Ig más importante para la FC y para el ELISAI. Al igual que sucede con la IgM, esta Ig aglutina mejor a pH ácido. Tienen una gran capacidad para fijar el complemento, actividad que no está influenciada por el pH y también está implicada en las aglutinaciones inespecíficas por Ac naturales, pero menos que la IgM (MacMillan, 1990). La IgG1 también está implicada en las reacciones cruzadas originadas por microorganismos próximos a *Brucella* spp. debido a su avidez por epítomos de la cadena O del LPS.

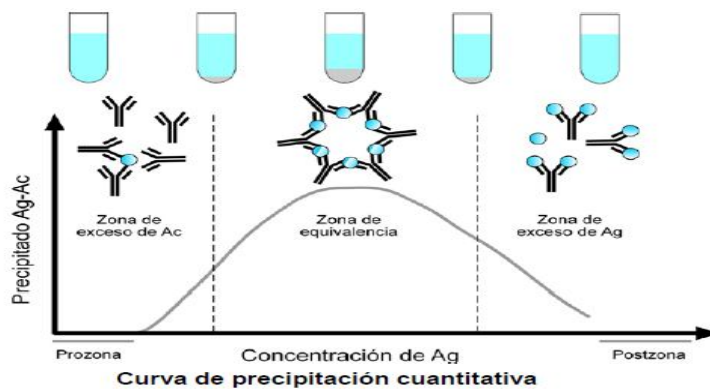
Aunque la IgG2 también aparece en animales con infecciones naturales lo hace más tarde que la IgG1 y los niveles que alcanza son más bajos y menos prolongados que los de la IgG1. La IgG2 no está implicada en las reacciones inespecíficas de los sueros de

animales negativos ni en la respuesta a la vacunación con B19 (MacMillan, 1990). La IgG2 tiene una buena capacidad aglutinante, pero muy poca capacidad para fijar el complemento siendo responsable de los fenómenos de prozona (figura 13), que se caracterizan por la existencia de sueros con resultados negativos a FC en diluciones bajas y positivos a diluciones altas (Blasco, 1994). Estos fenómenos se producen principalmente en animales después del parto o del aborto debido a la eliminación de una gran cantidad de IgG1 por el calostro. Este hecho origina la existencia de unas cantidades muy elevadas de IgG2 relativas en el suero capaces de bloquear a la IgG1 presente e impedir la fijación del complemento.

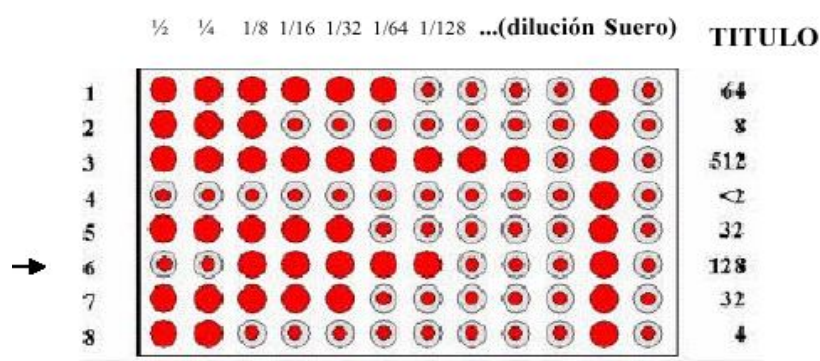
**Figura 13. Fenómeno de prozona en reacciones secundarias**

Disponible en: [www.ucm.es/info/saniani/troncales/inmunologia/.../Tema%2013.pdf](http://www.ucm.es/info/saniani/troncales/inmunologia/.../Tema%2013.pdf)

A- Prozona en una reacción de precipitación en medio líquido



B.- Prozona en una reacción de aglutinación cuantitativa



## 6. Diagnóstico

La Ley 8/2003 de sanidad animal establece en el artículo 25 del Capítulo III que será la Administración General del Estado quién determinará a que programas nacionales de prevención, lucha y erradicación de enfermedades de los animales se someten las cabañas ganaderas correspondientes. En el supuesto de que un programa no esté regulado expresamente, será de aplicación el Capítulo III de esta ley. En el Capítulo V la ley hace referencia a los laboratorios de ensayo y establece que solo tendrán carácter oficial los ensayos realizados en laboratorios oficiales. Estos laboratorios podrán ser de titularidad pública o privada y deberán ser designados como tales por la administración competente en materia de sanidad animal.

Por otro lado, la Orden ARM/83/2009 establece que la brucelosis bovina es de obligada comunicación a la UE y a la OIE. La erradicación de la brucelosis está regulada por programas nacionales específicos elaborados por la Administración General del Estado. Además, el RD 1047/2003 establece que los métodos de diagnóstico a utilizar deberán ajustarse a lo dispuesto en el MPDOIE, *Capítulo 2.3.1. Brucelosis bovina* (la última actualización del manual es del 16 de abril de 2008 y está disponible en la siguiente dirección: [http://www.oie.int/esp/normes/mmanual/e\\_summry.htm](http://www.oie.int/esp/normes/mmanual/e_summry.htm) )

Además de las observaciones clínicas realizadas por los veterinarios, el diagnóstico de la brucelosis animal se basa en el uso de pruebas de laboratorio directas para el aislamiento bacteriológico o pruebas indirectas para la demostración de respuestas serológicas o celulares específicas. Sin embargo, sólo las pruebas directas confirman la presencia de la infección ya que en el resto de los test la presencia de Ac o la existencia de una respuesta celular en un determinado animal no significa necesariamente que éste sufra una infección activa por *Brucella* spp., pero la normativa que regula los programas de erradicación determina que todos los animales positivos a alguna prueba diagnóstica oficial, al igual que todos los que tuvieron contacto directo o indirecto con éste, deben ser considerados sospechosos. Esta consideración es independientemente de la situación y/o de los antecedentes sanitarios de la explotación y todos los animales afectados deben ser sometidos a medidas específicas de control. En caso de duda sobre su estado sanitario prevalecerán las medidas más estrictas que garanticen el máximo control de la enfermedad.

Por todo ello, se han desarrollado muchas técnicas de diagnóstico directas e indirectas. Las pruebas directas son las únicas que pueden asegurar la presencia de la infección, pero su dificultad de aplicación en grandes poblaciones animales determina la necesidad de utilizar las pruebas indirectas y, dentro de éstas, las basadas en la detección de Ac.

### 6.1. Relación estructura antigénica-pruebas diagnósticas

Dado que los métodos indirectos se basan en la reacción Ag-Ac para entender su funcionamiento es necesario conocer algunos aspectos relacionados con los Ag del microorganismo.

*Brucella* spp. cuenta en su estructura con una gran variedad de Ag (figura 1) siendo los más importantes los siguientes: el LPS, las proteínas citosólicas y periplásmicas y el NH. Estos Ag pueden estimular la producción de Ac específicos y ser utilizadas para diagnóstico tal como se indica en la tabla 8.

La existencia de epítomos comunes (A,M y C) en el LPS de los diferentes géneros de *Brucella*, así como la capacidad de los Ac de reaccionar con varios de ellos al mismo tiempo, determina que en las pruebas diagnósticas diseñadas para la detección de Ac frente al LPS-S de *Brucella* spp. sea indiferente que el Ag proceda de *B. abortus* o de *B. mellitensis* (Moriyón y López-Goñi, 2002).

**Tabla 8. Principales Ag brucelares utilizados en el diagnóstico indirecto. Modificada de Moriyón y López-Goñi, 2002.**

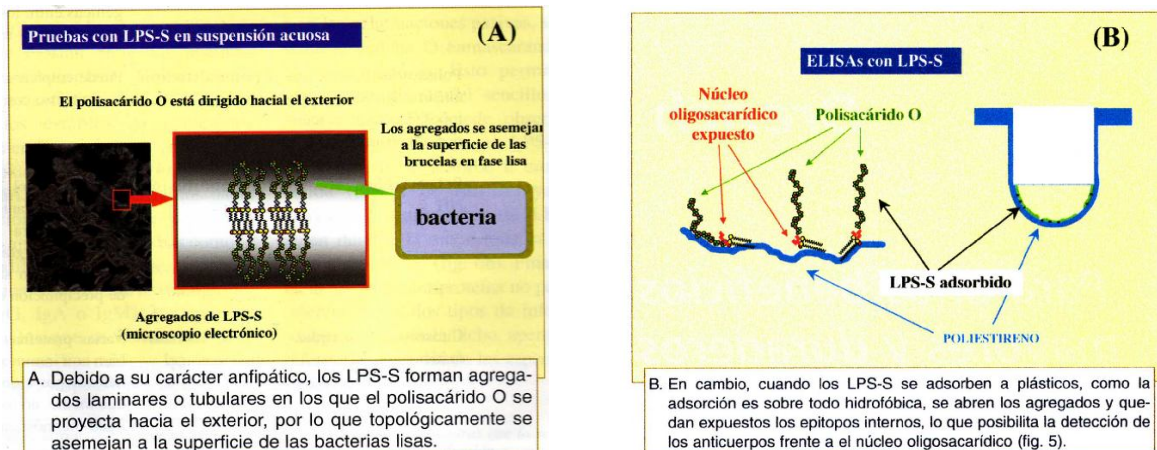
Ag para diagnóstico	Naturaleza y características más relevantes	Técnica diagnóstica de uso
Suspensión celular	Bacterias lisas completas inactivadas. En diagnóstico se suele emplear la cepa vacunal de <i>B. abortus</i> 19 inactivada. A efectos prácticos, sólo detecta Ac frente a epítomos de la cadena O.	RB, AMRB, FC
LPS-S	Ag simple constituido por el LPS de las formas lisas. Se obtiene de <i>B. abortus</i> o <i>B. mellitensis</i> por diferentes procedimientos. Suelen estar contaminados por otros componentes como proteínas de membrana o lípidos. Los epítomos relevantes están en la cadena O y son de tipo C.	ELISA, inmunodifusión en gel
Polisacárido O	Es un Ag simple correspondiente a la fracción inmunodominante del LPS. Se obtiene a partir de éste por hidrólisis ácida y contiene una altísima densidad de epítomos de tipo C. También se puede obtener por hidrólisis de bacterias lisas, pero en este caso aparece mezclado con NH.	ELISA, polarización por fluorescencia, inmunodifusión en gel
NH	Es un Ag simple de naturaleza polisacáridica muy similar a la cadena O del LPS, pero no igual. También presente una altísima densidad de epítomos C.	Inmunodifusión en gel
Proteínas	Constituyen un Ag simple de origen citosólico o periplásmico. Usadas individualmente no parece que tengan la Se del LPS-S.	ELISA, inmunodifusión en gel
Brucelina	Es un Ag simple de origen celular formado por proteínas no identificadas en su totalidad.	Hipersensibilidad celular retardada, inmunodifusión en gel

El Ag con mayor poder inmunógeno de *Brucella* spp. es el LPS-S siendo el más utilizado en el diagnóstico. Este Ag es capaz de originar una respuesta humoral duradera con elevados niveles de Ig en el suero de los animales afectados. El LPS-S es una molécula anfipática y como tal consta de una parte polar, o hidrófila, que puede estar en contacto con el agua y una parte apolar, o hidrófoba, que no puede estar en contacto con el agua. Por eso, cuando el LPS-S se utiliza como Ag en pruebas de aglutinación su cadena O se dispone hacia el exterior y el Ag se comporta como la superficie de una bacteria lisa frente a los Ac específicos que pueda presentar

el suero (figura 14-A). Sin embargo, cuando el LPS-S se absorbe a plásticos, como sucede en el los test de ELISA, una parte de los Ag internos quedan al descubierto y esta sería la causa de porqué Ac producidos frente a vacunas rugosas podrían interferir en el diagnóstico de la brucelosis cuando se utilizan estos test (figura 14-B).

El NH tiene una estructura similar a la cadena O del LPS-S y también se utiliza como Ag en pruebas diagnósticas (tabla 8). La vacunación de novillas con B19 o no induce la producción de Ac precipitantes frente al NH o si se producen desaparecen rápidamente. Sin embargo, estos Ac si aparecen en las infecciones naturales. Por tanto, la precipitación del NH requeriría la presencia de Ac de alta afinidad y títulos relativamente elevados. En base a esta circunstancia, se han desarrollado técnicas de precipitación con NH que permitirían distinguir animales enfermos de animales vacunados (Moriyón y López-Goñi, 1994).

Figura 14. Disposición espacial del LPS-S según su uso en pruebas diagnósticas (Moriyón y López-Goñi, 2002)



Las proteínas de la membrana externa generan una respuesta inmunológica mucho menor que la que se produce contra el LPS-S. Sin embargo, la respuesta que se obtiene en el caso de las cepas rugosas es mucho más intensa al carecer el LPS de la cadena O. De todas formas, en el diagnóstico de cepas lisas, los datos obtenidos sobre su actividad antigénica son variables según el individuo y de intensidad menor que frente al LPS-S por lo que el empleo de una sola de ellas no parece muy adecuado para diagnóstico (Moriyón y López-Goñi, 1994).

En *Brucella* spp. se han sido identificadas varias proteínas periplásmicas inmunogénicas, siendo la más significativa la SOD dependiente de cobre y zinc. Entre las proteínas citosólicas se han caracterizado las proteínas del estrés térmico: GroEL, GroES, DnaK, HtrA; la bacterioferritina o proteínas ribosomales, entre otras (Estein, 2006). Al tratarse de componentes internos de la bacteria, la respuesta inmune no se produce hasta que no comienza su destrucción por los mecanismos inmunes humorales y/o celulares del hoppedador. Algunos de estos componentes se ha demostrado que son capaces de desarrollar una respuesta inmune y pueden ser



potencialmente utilizados como test diagnósticos, pero con una respuesta menos consistente que frente al LPS y de una menor Se diagnóstica (Corbel, 1997).

Es importante mencionar que *Brucella* spp. presenta Ag comunes con otras bacterias, como *Escherichia coli* O:57, *Yersinia enterocolítica* O:9, *Vibrio cholerae* O1, *Salmonella* group N (O:30) y otras Gram negativas, por lo que pueden existir reacciones cruzadas en animales infectados por estas bacterias (Muñoz y cols., 2005).

## 6.2. Pruebas diagnósticas directas

Estas pruebas tienen por objeto detectar el agente implicado en la enfermedad. Su principal limitación radica en la dificultad para aplicarlos en grandes poblaciones de animales, como sucede en el desarrollo de los programas de erradicación.

### 6.2.1 Tinciones

Las brucelas pueden ser puestas de manifiesto sobre frotis de órganos o de escobillones, mediante coloraciones especiales. Las más utilizadas son la de Stamp y la de Köster modificada (Verger, 1994). Son técnicas poco sensibles y específicas por lo que no tiene más que un valor presuntivo.

### 6.2.2 Cultivo, aislamiento e identificación

El aislamiento es el ensayo que realmente confirma el diagnóstico con una certeza absoluta. Es la técnica “gold standard”, en la que después del aislamiento del microorganismo, se continúa con su caracterización bacteriológica que incluye el género, la especie y la subespecie o biotipo (Alton y Jones, 1976). A pesar de las ventajas de este método tiene inconvenientes importantes: el crecimiento de las bacterias es lento en los medios empleados por lo que se retrasa mucho el diagnóstico, se precisan instalaciones importantes para permitir procesar un número elevado de muestras, es necesario personal muy cualificado para la identificación de las bacterias y los laboratorios deberán disponer de medidas de seguridad elevadas por tratarse de un agente responsable de zoonosis.

El aislamiento puede realizarse a partir de tejidos y fluidos muy diversos. La muestra más recomendable es el escobillón tomado directamente de la vagina de los animales abortados y el propio feto. Además, la leche es una muestra muy recomendable ya que más del 80% de los animales infectados excretan *Brucella* spp. por esta vía. También se puede conseguir el aislamiento a partir de muestras de ganglios retromamarios, ilíacos, retrofaríngeos y parotídeos. Finalmente, los órganos de elección para el aislamiento incluyen el bazo, la mama y el útero.

El cultivo se realiza en atmósfera enriquecida con un 5-10% de CO<sub>2</sub> en medios selectivos de Farrell y de Thayer-Martin (figura 24 y 25).

### 6.2.3 Reacción en cadena de la polimerasa

La PCR se ha desarrollado a partir de finales de la década de los 80. En la actualidad existen numerosos protocolos para el diagnóstico de la brucelosis y es una técnica que está en continuo avance. Sus principales características son: alta Se y Sp, de ejecución rápida, económica, reproducible y adaptable al procesamiento de un gran número de muestras (Bricker, 2002). Las estrategias aplicadas en el desarrollo de los procedimientos están en función de los objetivos y/o de los usos perseguidos. En el diagnóstico en humanos y en el estudio de contaminaciones de alimentos se persigue la diferenciación del género. Sin embargo, en la investigación epidemiológica y en los programas de erradicación interesa la diferenciación de especies, biotipos y cepas vacunales.

Las PCR diseñadas para el diagnóstico de género son simples y robustas, pero las desarrolladas para diferenciar especie y biovars son complejas y difíciles de optimizar. Bricker (2002) las clasificó en tres grandes grupos:

1. Ensayos diseñados con “primers” altamente específicos y condiciones de ensayo muy estrictas.
2. Ensayos diseñados con “primers” semiespecíficos y condiciones de ensayo más permisivas.
3. Ensayos basados en la amplificación aleatoria de “primers” bajo condiciones permisivas.

Se han desarrollado procedimientos de PCR para el diagnóstico directo de *Brucella* spp. en muchos tipos de muestras biológicas de animales: tejidos fetales, leche, secreciones nasales o semen, pero también para diagnóstico directo en alimentos como leche o queso.

Las técnicas de PCR presentan dos dificultades principales en su ejecución. La primera de ellas es la obtención del material genético de *Brucella* spp. directamente de las muestras debido a la gran cantidad de sustancias capaces de inhibir la PCR y a la existencia del DNA de las células del hospedador. La segunda gran dificultad es la facilidad con la que se pueden contaminar las muestras y los reactivos con material genético presente en el medio ambiente del laboratorio o en alguno de los equipos de ensayo. Cuando se producen estas contaminaciones se suelen alterar completamente los resultados, siendo en muchas ocasiones imposible determinar su origen exacto.

### 6.3. Pruebas diagnósticas indirectas

Estas pruebas son las más importantes en el diagnóstico de la brucelosis. Son utilizadas sistemáticamente en los programas de erradicación por su elevada Se y Sp, y por la facilidad para procesar un gran número de muestras en períodos de tiempo muy cortos. Todas ellas se basan en la detección de cualquiera de los Ac específicos producidos por el organismo frente a *Brucella* spp. Como se indicó en el apartado relacionado con la estructura antigénica, la principal

respuesta humoral se produce frente al LPS. También se ha observado la presencia de una respuesta humoral frente a otros componentes como las proteínas de la membrana o el NH. Los niveles de Ac varían con la capacidad de reacción del sistema inmunitario de cada animal según el curso de la enfermedad, con la existencia de reinfecciones y por la vacunación. Por tanto, todos estos factores pueden condicionar los resultados obtenidos con este tipo de pruebas.

**Tabla 9. Clasificación de las pruebas serológicas según el isotipo de inmunoglobulina que interviene en la reacción (Díaz y Blasco, 1994)**

Isotipo de IG	Prueba serológica
IgM	SAT (Seroaglutinación lenta en tubo), RB (Rosa de Bengala), FC (Fijación de complemento), Ring test .
IgG <sub>1</sub>	RB y FC
IgG <sub>2</sub>	SAT
IgA	Aglutinación con 2-Mercaptoetanol y Rivanol, Ring Test
Pueden determinar y cuantificar los isotipos de Ig implicada	ELISA, RIA (Radioinmunoensayo), IFI (Inmunofluorescencia indirecta)

Las pruebas serológicas utilizadas se pueden clasificar en dos grandes grupos:

1. Pruebas de unión primarias: se basan en el reconocimiento y unión de Ag y Ac, para formar inmunocomplejos, cuya cantidad será medida por diferentes métodos: radioisótopos, fluorescencia o marcadores enzimáticos. Un ejemplo de este tipo de pruebas la constituyen los ELISAs.
2. Pruebas de unión secundarias: primero se produce la unión Ag-Ac y, a continuación, las reacciones secundarias miden los cambios físicos de esa interacción, tras la formación de los inmunocomplejos. Son independientes de la reacción de unión del Ag y el Ac. Un ejemplo de este tipo de pruebas la constituyen los test de aglutinación.

Las técnicas serológicas han evolucionado constantemente desde que se empezaron a aplicar hace más de 100 años. En general, a medida que se fueron detectando limitaciones con su uso, se fueron incorporando otras que intentaban resolver esas limitaciones. Los primeros test utilizados fueron los de aglutinación. Estas técnicas eran económicas, fáciles de ejecutar y con una Se y una Sp aceptable. Posteriormente se desarrollaron las técnicas de precipitación y finalmente los ensayos de unión primaria, en los que destacan los ELISAs.

La mayor parte de los test serológicos detectan Ac frente a la cadena O del LPS-S. Esto significa que los test diagnósticos basados en este Ag son capaces de detectar las tres

principales especies del género *Brucella*: *B. abortus*, *B. melitensis* y *B. suis*. Las técnicas serológicas que utilicen como Ag *B. abortus* son capaces de detectar cepas lisas como *B. neotomae* y *Brucella* spp. de mamíferos marinos (Nielsen, 2002). Las cepas rugosas pueden ser detectadas con ensayos que utilicen Ag de cepas rugosas constituidas básicamente por extractos de proteínas de membrana externa y LPS-R (Blasco y Gamazo, 1994).

Los principales problemas surgidos con el diagnóstico serológico de *B. abortus* están relacionados con la existencia de reacciones cruzadas con otras bacterias Gram negativas con las que comparten la estructura de la pared bacteriana y la dificultad para discernir entre Ac vacunales y Ac de infecciones naturales.

Para el diagnóstico de la brucelosis se recomienda el uso de dos técnicas en serie. La primera de ellas usada de cribado debe ser muy sensible mientras que la segunda usada como prueba de confirmación debe ser muy específica. Los programas de erradicación realizados en España incluyen como prueba de cribado la aglutinación en placa o en microplaca con rosa de Bengala y como prueba de confirmación la FC.

Adicionalmente, cada prueba tiene habilidad para detectar diferentes isotipos de Ac como se indica en la tabla 9. Esta característica es muy importante a la hora de comparar test diagnósticos entre sí.

Los principales test utilizados para el diagnóstico de brucelosis están descritos en el MPDOIE (OIE, 2004). A continuación, se describen las características más importantes de los principales test diagnósticos utilizados en el control de *B. abortus*.

### **6.3.1. Aglutinación en macroplaca con rosa de Bengala**

La aglutinación en macroplaca con rosa de Bengala (RB) es una prueba de unión secundaria usándose como Ag una célula muerta de *B. abortus* S99 o S1119-3. Es una prueba de aglutinación rápida que se realiza sobre una placa o en microplaca. Las bacterias se encuentran suspendidas en un tampón lactato a pH 3,6 y teñidas con rosa de Bengala lo que permite una mejor visualización de la reacción de aglutinación.

Se caracteriza fundamentalmente por su sencillez y su elevada Se, siendo la prueba de elección para los ensayos de cribado.

Los test de aglutinación pueden presentar reacciones inespecíficas debido a las IgM. En el caso de la RB se disminuye este efecto mediante la acidificación del Ag por lo que las reacciones que se producen son debidas básicamente a las IgG1. El RB puede dar resultados falsos negativos debido a fenómenos de prozona (figura 13). También se han observado reacciones cruzadas con Ac procedentes de la vacunación de los animales con B19 (OIE, 2004; Nielsen, 2002).

Los resultados positivos deben ser confirmados por otros test más específicos, siendo el más utilizado la FC.

### 6.3.2. Prueba del anillo o ring test

Es una técnica sencilla y fácil de utilizar. Su éxito en programas de erradicación se atribuye más a la frecuencia de utilización que a su Se, ya que éste disminuye con el tamaño del rebaño (Fensterbank, 1986). El Ag utilizado está formado por células completas de *B. abortus* S99 o S1119-3 teñidas con hematoxilina (color azul) o tetrazolio (color rojo). El Ag se utiliza a pH entre 3,3 y 3,7. La prueba se realiza sobre leche de tanque de rebaños lactantes. Si el Ac está presente se une a los glóbulos grasos de la leche por la fracción Fc. A continuación, los Ac aglutinarán al Ag y los glóbulos grasos aumentarán de tamaño. Como consecuencia aparecerá una banda de coloración en la nata más intensa que en la parte desnatada. Si los Ac no están presentes, la coloración se distribuye por igual en ambas partes o incluso es menos intensa en la capa de nata (Alton y Jones, 1976).

Sus principales limitaciones vienen derivados del descenso de la Se en rebaños grandes con más de 100 animales lactantes. Puede presentar falsos positivos cuando se utiliza en animales vacunados hasta con cuatro meses de antelación a su uso. También puede presentar falsos positivos cuando se utiliza en calostro, en leche mamética (OIE, 2004) y en la leche obtenida al final de la lactación (Nielsen, 2002).

### 6.3.3. Fijación de complemento

Es la prueba de confirmación más utilizada en la mayoría de los países debido a su Sp. Detecta isotipos IgM e IgG que al reaccionar con el Ag brucelar activan el complemento. La reacción se evidencia mediante la participación de los eritrocitos de carnero incluidos en el complejo hemolítico. Este test se utiliza en los programas de erradicación de la brucelosis en Galicia desde el año 1990 junto con la AMRB.

Las principales limitaciones de este test están relacionadas con la dificultad de realización. El proceso es largo y complejo, los reactivos son difíciles de estandarizar y se necesitan en gran cantidad.

Puede presentar resultados inadecuados. Con algunos sueros se pueden producir falsos resultados positivos denominados poder anticomplementario (PA), porque son capaces de activar el complemento sin la presencia de Ag brucelar. En otros casos se pueden producir resultados falsos negativos debidos a fenómenos de prozona (figura 13). Por último, esta técnica no tiene capacidad para distinguir entre Ac vacunales y Ac procedentes de infecciones de campo.

### 6.3.4. Inmunodifusión radial

Son pruebas de precipitación en gel con NH o polisacárido B como Ag. En estas técnicas el suero problema reacciona con el Ag en un gel dando lugar a una línea de precipitación en el punto de la reacción Ag-Ac. Existen dos tipos básicos, la doble difusión y

la inmunodifusión radial inversa. En el primer caso, el Ag se coloca en un pocillo central y los sueros objeto de estudio se sitúan en pocillos alrededor del central. Los sueros positivos producen una doble línea de reacción, los animales vacunados una y los negativos ninguna. En la segunda técnica el Ag es incorporado al gel. Si el suero contiene Ac específicos se genera un anillo de precipitación alrededor del pocillo que lo contiene. Sin embargo, los animales vacunados y negativos no generan estas bandas (Díaz y Blasco, 1994).

La principal ventaja de estos test es que permiten diferenciar animales vacunados de infecciones de campo debido a la menor avidez de los Ac vacunales en relación a los Ac de las infecciones naturales. Pese a ello, estas pruebas no se han aplicado para el control oficial de la brucelosis en bovino, ovino o caprino (Blasco, 2002a).

La Se óptima se obtiene por el sistema de la inmunodifusión radial inversa y además muestra una buena correlación entre un resultado positivo y la excreción de *Brucella* spp. por el animal investigado (OIE, 2004).

### 6.3.5. ELISAs

Los dos tipos de ELISAs utilizados en el diagnóstico de brucelosis son el indirecto y el de competición. Su principal ventaja la constituye su facilidad para la automatización y para la interpretación de los resultados. Ambos test se basan en la detección de Ac específicos frente a *Brucella* spp. El ELISAI detecta IgG, mientras que el ELISA competición (ELISAc) puede detectar IgM, IgG e IgA.

Se han descrito muchos tipos de ELISAI para el diagnóstico de la brucelosis. En general, la mayor parte de ellos utilizan como Ag el LPS-S fijado a un soporte de poliestireno. El protocolo común parte de la adición de los sueros a los pocillos tapizados con el Ag. Si los sueros tienen Ac se unirán al Ag formando un complejo. A continuación se añade un anti-Ac específico unido a una enzima capaz de degradar un sustrato produciendo color, que será cuantificado por medio de la densidad óptica (DO) obtenida con un espectrofotómetro. La OIE dispone de una versión validada que se basa en la detección de IgG1 que es el Ac más comúnmente utilizado, si bien esta técnica permitiría detectar cualquier tipo de Ac en función del anti-Ac utilizado. El diagnóstico puede ser llevado a cabo tanto en muestras de leche como en muestras de suero (OIE, 2004).

El ELISAc presenta como principal diferencia con el indirecto, el hecho de que los Ac eventualmente presentes en el suero deben competir con un Mab frente a un epítipo de la cadena O del LPS. Posteriormente, un anti-Ac frente al Mab conjugado a una enzima, es añadido a la mezcla. Esta enzima actuará sobre un sustrato emitiendo color. A diferencia de los ELISAI, en los de competición los sueros positivos no presentarán color debido a que el Mab no se ha fijado al Ag y, por tanto, la enzima conjugada es eliminada con los sucesivos lavados de la reacción. El ELISAc parece tener una mayor Sp que el ELISAI (OIE, 2004). Este ensayo parece ser capaz de diferenciar Ac vacunales de Ac de infecciones de campo,

debido a la menor afinidad de los primeros por los epítomos de la cadena O del LPS en relación a la afinidad del Mab (Nielsen, 2002).

Ambos ELISAs deberán estar calibrados con respecto a los sueros estándar de la OIE fuertemente positivos, positivo débil y suero negativo (OIE, 2004).

## **6.4. Pruebas diagnósticas basadas en la inmunidad celular**

### **6.4.1. Pruebas alérgicas**

Se basan en poner de manifiesto reacciones de hipersensibilidad retardada “in vivo” mediante la inoculación de alérgenos adecuados (Díaz y Blasco, 1994). Los Ag utilizados están formados por componentes proteicos y desprovistos de LPS. Esta prueba es muy específica, de modo que los animales sin vacunar que son serológicamente negativos y reaccionan positivamente a esta prueba deben ser considerados animales infectados, pero no todos los animales positivos reaccionan a la prueba, por lo que no es recomendable que sea utilizada sola para el control de la enfermedad. La utilización de este test también está recomendada para la investigación de reacciones cruzadas debidas a otras bacterias Gram negativas. Además, los animales investigados por este test desarrollan una anergia temporal de la respuesta inmune celular (OIE, 2004).

El inconveniente principal de este tipo de pruebas es que los animales vacunados con vacunas inactivadas o atenuadas son positivos durante mucho tiempo, por lo que su utilidad en zonas donde se realiza algún tipo de vacunación es nula (Díaz y Blasco, 1994).

## **7. Medidas de control y erradicación**

Se desarrollan programas sanitarios para la erradicación de la brucelosis animal en todo el mundo y desde hace mucho tiempo. En Estados Unidos, los programas se iniciaron en 1934 con la realización de test para la detección de Ac en sueros, sacrificio de positivos e indemnización por sacrificio (Nicoletti, 2002). En México, se establece el programa nacional en 1971 con vacunaciones y test de diagnóstico (Luna-Martínez y Mejía-Terán, 2002). En Venezuela se inician las vacunaciones con B19 en 1956 (Francisco y Vargas, 2002). En China se iniciaron las vacunaciones en 1964 (Dequiu y cols., 2002). Todos los países pertenecientes a la UE cuentan con programas de control y erradicación de la brucelosis, estando muchos de ellos libres de la enfermedad, tal y como se indica en el apartado correspondiente de la distribución de la brucelosis en el mundo. En España, el primer programa nacional de erradicación con suficiente entidad se inició en 1978 (Blasco, 1986).

### **7.1. Estrategias de control y erradicación de la brucelosis**

Los aspectos epidemiológicos que determinan la dificultad de la erradicación de la brucelosis se pueden concretar en los siguientes:

- Los animales infectados eliminan un gran número de bacterias en el momento del aborto o el parto.
- La eliminación de bacterias en leche se puede mantener durante toda la vida del animal.
- Existen animales nacidos de vacas infectadas con infecciones latentes que manifiestan los síntomas de la enfermedad en el momento del parto o aborto
- También existen animales infectados con curación aparente que, sin embargo, pueden permanecer eliminadores durante toda su vida.
- La bacteria presenta una gran resistencia en el medio ambiente (tabla 3).

Por tanto, las estrategias de control deben de tener en cuenta todos estos aspectos para la consecución del objetivo final que no es otro que la erradicación de la enfermedad.

Previo al establecimiento de un programa de control es necesario conocer la situación epidemiológica de la enfermedad y evaluar la relación entre los recursos necesarios y los recursos disponibles para fijar los objetivos del programa, así como la estimación del tiempo necesario para la consecución de los mismos.

Los requisitos imprescindibles para abordar con éxito un programa de erradicación de la brucelosis, según Blasco (2002b) son los siguientes:

- Establecer las áreas de actuación que deberán tener unas características epidemiológicas homogéneas.
- Los servicios veterinarios dispondrán de medios técnicos, humanos y financieros suficientes.
- Los programas se diseñarán pensando en su continuidad a lo largo del tiempo (entre 10 y 20 años como mínimo).
- Se evaluará la situación epidemiológica de la enfermedad antes del inicio del programa de actuación
- Se dispondrá de información exhaustiva sobre los sistemas de producción, la coexistencia de especies diferentes, el sistema de identificación de los animales y todos los aspectos relacionados con el movimiento (origen y destino de los animales, zonas de concentración, especies objeto de movimiento, intensidad de los movimientos, criterios de reposición en las explotaciones, etc).

En general, partiendo de la prevalencia de la enfermedad en la población objeto de actuación, y sin tener en cuenta otros aspectos fundamentales, se pueden establecer cuatro tipos de estrategias de actuación (Plommet, 1994):

- La primera de ellas sería de aplicación en áreas con prevalencias muy elevadas por explotación, mayores del 10-15%. En este caso sería necesario el establecimiento de un programa sistemático de vacunación de toda la población, o en su defecto de la mayor parte de la misma, tanto de animales adultos como de jóvenes, con el objetivo de reducir



la eliminación de bacterias y conseguir con el tiempo un nivel de prevalencia por debajo del 10%.

- La segunda estrategia sería de aplicación en áreas con prevalencias entre el 5 y 10% en explotación, en cuyo caso se establecería un programa mixto de vacunación y de sacrificio de reactores positivos. En esta situación, la coexistencia de Ac vacunales y Ac de infecciones de campo presenta un problema importante desde el punto de vista diagnóstico en relación a la imposibilidad de diferenciar unos de otros.
- La tercera estrategia, de aplicación para prevalencias menores del 5%, consistiría en la erradicación por diagnóstico y sacrificio sin uso de vacunación, sistemática aplicada en Galicia desde 1990.
- Por último, la situación de vigilancia y control en zonas libres de la enfermedad que básicamente consistiría en el establecimiento de controles periódicos de los animales tanto en las explotaciones como en los movimientos de aquellos procedentes de otras zonas para impedir la entrada de la infección. En esta situación se reduciría de forma considerable el número de controles tanto en leche como en suero para la detección de Ac.

En las zonas libres de la UE los controles se reducen a un 20% anual del censo de ganado vacuno. Sin embargo, existen estudios realizados en el Reino Unido que cuestionan esta reducción tan drástica porque no se garantiza un control adecuado para prevenir de forma efectiva la reaparición de la infección (Jones y cols., 2004).

## **7.2. Profilaxis mediante el uso de vacunas**

Como se indicaba en el apartado anterior, una de las principales herramientas para la profilaxis de la brucelosis está constituida por el uso de vacunas. Las dos más utilizadas hasta la fecha han sido las vivas obtenidas a partir de cepas lisas: la B19 obtenida de *B. abortus*, para ganado vacuno y la Rev 1, obtenida de *B. mellitensis*, para pequeños rumiantes. Las vacuna viva inactivada procedente de cepas rugosas utilizada inicialmente fue la 45/20 y en la actualidad la RB51. El uso de esta última en ganado vacuno radica en el hecho de que al carecer de los Ag de superficie característicos de las cepas lisas no induce reacciones cruzadas con los test de diagnóstico clásicos que utilizan Ag en fases lisa (Blasco, 2002b). Sin embargo, su uso en bovino ha generado resultados contradictorios en relación al nivel de protección obtenido en animales vacunados dependiendo de la vía de administración, de las dosis, de la edad del animal vacunado y de la prevalencia de la enfermedad en el área de aplicación (Estein, 2006).

En ganado vacuno, la B19 se ha utilizado con tres protocolos diferentes de aplicación (Plommet, 1994). En primer lugar, en terneras de reposición entre los cuatro y los siete meses de vida a una dosis de  $60-90 \times 10^9$  *B. abortus* S19 por vía subcutánea. En segundo lugar, en vacas adultas por vía subcutánea, a una dosis reducida de  $5$  a  $10 \times 10^9$  *B. abortus* S19. Por último, la

vacunación de jóvenes y/o adultas con dos administraciones de  $5$  a  $10 \times 10^9$  *B. abortus* S19 por vía conjuntival, cuya principal ventaja es originar títulos de Ac de baja intensidad y de corta duración de carácter protector, pero con mucha menor capacidad de interferir con las técnicas diagnósticas clásicas.

En la actualidad la investigación para el desarrollo de nuevas vacunas está dirigida a la obtención de nuevos mutantes rugosos y a la obtención de cepas lisas deficientes en determinados Ag proteicos para su uso como vacunas marcadas (Blasco, 2002b).

### **7.3. Estrategia para el control de la brucelosis en Galicia**

Las bases de los programas oficiales para el control de la brucelosis en Galicia se establecen a finales de la década de los 80 y con más intensidad a partir del año 1988. Es en este año cuando la Consellería de Agricultura asume directamente la realización de las CSG a través de la Dirección Xeral de Producción Agropecuaria e Industrias Agroalimentarias. De la experiencia adquirida en años anteriores se establece la estructura básica de estos programas que “*grosso modo*” se mantienen hasta el año 2001 con la aparición de la encefalopatía espongiforme bovina en España y, más concretamente, en Galicia.

En esencia, se establecen unos Servicios Centrales (SC) responsables de fijar las directrices de actuación y unos Servicios Veterinarios Provinciales (SVP), uno por provincia, responsables de la ejecución, y supervisión de los programas en su ámbito territorial correspondiente. Los SVP también serán los responsables de la informatización de todos los datos recogidos y del establecimiento posterior de las calificaciones sanitarias de las explotaciones. A su vez, cada provincia se divide en áreas, formadas por varios ayuntamientos próximos entre sí. Al frente de cada una de estas áreas se establece la figura del Veterinario Coordinador (VC) que actúa de enlace entre los ganaderos y la Administración. Cada VC cuenta para la realización de sus funciones con varios Equipos de Campo (EC), formados por dos veterinarios, que son los responsables de los trabajos de campo.

Al mismo tiempo se establece la estructura de laboratorios con tres centros distribuidos por la CA en Lugo, A Coruña y Pontevedra.

La unidad básica de actuación se concreta a nivel de explotación. En una primera actuación se realiza una toma de muestras de suero de los animales de la explotación. Las muestras son trasladadas al laboratorio para ser analizadas. Una vez obtenidos los resultados, los VCs los comunican a los EC. En el caso de resultados positivos, estos equipos los notifican a los ganaderos y proceden al marcaje de los animales. A continuación, elaboran la documentación necesaria para el traslado de los animales a mataderos autorizados para su sacrificio. En el matadero, con la ayuda de los veterinarios de Salud Pública, se procede a comprobar la concordancia entre la identidad y la documentación de los animales sacrificados. Durante este

período, los SVP proceden a la informatización de todos los datos obtenidos y a la tramitación de la indemnización correspondiente.

En el año 1990 se declara a toda la CA como área obligatoria de erradicación y se prohíbe la vacunación frente a la brucelosis, iniciándose la etapa definitiva para la erradicación de la enfermedad en Galicia.

Según Díaz y cols. (1997) el desarrollo de las CSG en Galicia se sustentó en cuatro pilares fundamentales que se comentan de forma resumida.

En primer lugar se estableció una base legislativa sólida, basada en la legislación comunitaria y nacional para el desarrollo de los PNE. Esta base legislativa autonómica se desarrolló acorde a la situación real de Galicia y se fue adecuando sistemáticamente a medida que cambiaba la situación sanitaria y se mejoraba la gestión de los programas sanitarios. En esta adecuación se mejoraron las indemnizaciones, se incrementaron los requisitos para la reposición de animales, se profundizó en el control de los operadores de ganado, se establecieron las bases para la calificación sanitaria de las explotaciones, se incrementaron los controles sobre el movimiento pecuario, se optimizaron los controles y las inmovilizaciones en las explotaciones con animales positivos al igual que se recortó el tiempo máximo para sacrificio de animales positivos. Además, se consolidó el control continuo de las explotaciones afectadas hasta la desaparición de reaccionantes y se prohibió la salida de animales de estas explotaciones excepto para el matadero. Por último se extremaron los controles en ferias y mercados y se intensificaron las medidas para la identificación animal.

En segundo lugar, la realización de estos programas precisó una base económica muy importante y durante muchos años. La cofinanciación de los programas se realizó con la aportación de las CCAA y la Administración del Estado. Una vez ejecutados los programas, la UE financió el 50% del total de cada programa anual.

En tercer lugar se desarrolló la base organizativa ya comentada al inicio de este apartado y esquematizada en el tabla 10. Ahora bien, debido a su importancia, se hace una pequeña referencia a aquellos aspectos técnicos más relevantes en un programa de erradicación. Los métodos de diagnóstico utilizados en el control de la brucelosis consistieron en el uso de un test muy sensible para cribado y de un test muy específico para confirmación. Como primer test se utilizó la AMRB y como test de confirmación se utilizó la FC. Una vez detectados los animales positivos se procedía a su eliminación por sacrificio. En las explotaciones afectadas se desarrolló un programa de desinfección y de seguimiento de la enfermedad, con toma de muestras sucesivas, en los casos en los que no se realizaba vacío sanitario. La reposición de animales se realizó con todas las garantías sanitarias posibles y se fomentó la reposición a través de la cría. También se aplicó un control riguroso de los movimientos, con especial énfasis en los que intervenían intermediarios. Por último, se establecieron medidas complementarias como el uso de otros test de diagnóstico (ELISA en tanque de leche) o la toma de muestras de animales sacrificados para aislamiento e identificación del microorganismo implicado.

En cuarto y último lugar, fue de especial importancia la base sociológica en la que se aplicó la CSG. Fue muy importante la aceptación de la opinión pública en general y resultó fundamental la implicación y la aceptación por parte de todos los sectores afectados. Las medidas de sacrificio obligatorio, la inmovilización de explotaciones y los controles rigurosos de los movimientos podrían haber originado un rechazo sistemático por parte de los afectados que imposibilitasen el éxito de estos programas. En este sentido, la información clara, el contacto permanente con los ganaderos e intermediarios, la colaboración de los veterinarios clínicos y las asociaciones de ganaderos, así como el pago de las indemnizaciones por sacrificio en períodos de tiempo cortos fueron factores fundamentales para conseguir el éxito de los programas.

**Tabla 10. Esquema de actuación de los Servicios Veterinarios Oficiales (SSVVOO) en las CSG**

1. Los SVO proceden a la toma de muestras de suero en las explotaciones para investigación de la brucelosis. Las muestras se identifican de forma trazable a la documentación. En esta última, figuran identificados todos los animales objeto de investigación.
2. Los sueros son remitidos al laboratorio para su análisis.
3. Los sueros son investigados a AMRB y los positivos son confirmados por FC.
4. Los resultados son comunicados a los SSVVOO.
5. Las explotaciones con animales positivos son inmovilizadas.
6. Sacrificio de animales positivos y toma de muestras de los acompañantes negativos.
7. De los animales sacrificados se realiza toma de muestras para la realización del aislamiento y la identificación del microorganismo implicado. Adicionalmente, se vuelve a tomar suero en el momento del sacrificio o en la explotación previo al envío al matadero.
8. Las nuevas muestra son enviadas al laboratorio para proceder a su análisis.
9. Los resultados son comunicados nuevamente a los SSVVOO.
10. Las actuaciones continuarán hasta disponer de dos pruebas negativas seguidas separadas un mínimo de tres meses en todos los animales presentes en la explotación objeto de control.
11. Informatización de los resultados y de la situación sanitaria de las explotaciones en bases de datos centralizadas y con acceso desde todo el ámbito físico de aplicación del programa sanitario.

## **B.- Revisión de la validación y verificación de técnicas diagnósticas**

### **8. Validación y verificación de test de ELISA**

#### ***8.1. Aspectos generales de la validación y verificación de un ensayo***

La armonización del diagnóstico de laboratorio en sanidad animal se sustenta en cuatro pilares básicos: la existencia de métodos de referencia o en su defecto, de métodos de sustitución, la estimación del rendimiento de los test de diagnóstico, la existencia de muestras de referencia y la demostración de la suficiencia técnica de los laboratorios de ensayo. A continuación se comenta brevemente alguno de estos aspectos.

Los métodos de referencia ofrecen, mejor que cualquier otro, un margen de confianza aceptable en la probabilidad de que los animales clasificados como positivos o negativos verdaderamente lo sean, independientemente del área mundial en la que se realicen los ensayos. Los resultados obtenidos por estos métodos son aceptados por todos los países de la OIE (Jacobson, 1998).

Los métodos de referencia están validados lo que implica que se han definido sus condiciones de uso, se conoce su exactitud y sus parámetros de rendimiento básicos: la Se y la Sp analítica y diagnóstica y los valores predictivos de sus resultados. La estimación de los parámetros de rendimiento se obtiene mediante el uso de sueros procedentes de animales cuya situación sanitaria, con respecto a la enfermedad objeto de estudio es conocida.

La trazabilidad entre métodos alternativos y métodos de referencia y la trazabilidad de los resultados obtenidos por los laboratorios de diagnóstico de rutina cuando aplican métodos validados se garantizan mediante el uso de estándares internacionales u otro tipo de muestras trazadas a esos estándares.

Finalmente, los laboratorios deben garantizar el comportamiento óptimo de los test de ensayo mediante el cumplimiento de normas de aseguramiento de la calidad que garanticen su competencia técnica. La norma básica que establece los requisitos generales para la competencia de los laboratorios es la UNE-EN ISO/IEC 17025.

Según las directrices establecidas por la Dirección General de Recursos Agrícolas y Ganaderos (DGRAG), del Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino (MARM), para la comercialización de cualquier reactivo de diagnóstico en el ámbito de la sanidad animal en España, deberá estar previamente autorizado por la autoridad competente. La documentación necesaria deberá incluir, entre otras cosas, un estudio de validación cuyo objetivo es garantizar que el test es adecuado para los fines previstos. Una vez que el test este aprobado, los

laboratorios que lo utilicen deberán demostrar que su comportamiento en el análisis de rutina se ajusta a lo esperado en la validación. Al conjunto de estas operaciones en los laboratorios de rutina se denominan verificación interna.

Tanto en la validación como en la verificación de un método es necesario estimar los valores de determinados parámetros. La relación de estos parámetros, así como sus valores aceptables deben ser fijados “a priori”.

Por tanto, la validación de un ensayo consiste en un proceso que permite confirmar que un método de prueba es idóneo para el objetivo perseguido. La norma ISO 8402 define a la validación como: *“confirmación mediante examen y provisión de evidencias objetivas de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico”*. La OIE ha establecido exhaustivamente las fases de la validación de un método de ensayo (OIE, 2008). Según esta organización, la validación tiene como objetivo presentar nuevos métodos de ensayo que obtengan el reconocimiento de la comunidad científica para un fin determinado en el ámbito de la sanidad animal. Para quien desarrolle el método, la validación incluye la exposición y verificación de las características de rendimiento del método con un nivel definido de fiabilidad estadística (OIE, 2008). Además deberá garantizar que los resultados obtenidos después de su ejecución sean coherentes y repetitivos permitiendo discriminar entre animales positivos y negativos para una sustancia o proceso determinado (por ejemplo: Ac) y, por inferencia, dictaminar con exactitud la condición de los animales con respecto a una posible infección, con un nivel predeterminado de certidumbre estadística (Jacobson, 1998).

Como complemento de la validación está la verificación interna. Su objetivo es garantizar el correcto funcionamiento de un método en un laboratorio en particular. Por tanto, esta actividad deberá ser previa al uso de cualquier test de diagnóstico. Los parámetros a evaluar en esta fase pueden ser comunes, e incluso coincidir, con los de la validación. Aunque en este último caso, el tipo y número de muestras necesarios para el cálculo de los parámetros son radicalmente diferentes (UNE-EN ISO/IEC 17025:2005). Todos estos aspectos serán tratados con más profundidad en los apartados siguientes.

## **8.2. La validación de un ELISA según la OIE**

### **8.2.1 Introducción a la validación de un ELISA**

Un laboratorio podrá participar en el desarrollo de un nuevo método, en la mejora de métodos existentes o en el uso de métodos normalizados y validados para el diagnóstico rutinario. El desarrollo de nuevos métodos está básicamente relacionado con laboratorios de investigación mientras que los laboratorios de diagnóstico oficial o del diagnóstico de rutina participan mediante el uso de métodos normalizados.

En general, el modelo de validación de métodos de ensayo propuesto por la OIE, que es el comentado en este apartado, está dirigido a métodos nuevos con el fin de que obtengan el reconocimiento de la comunidad científica.

El que un test este validado implica que están especificadas sus condiciones de uso, que se ha realizado un proceso de verificación inicial que incluye estudios de precisión y de exactitud en condiciones de repetibilidad y se ha evaluado su comportamiento en condiciones de reproducibilidad, que se conocen sus parámetros de rendimiento y que se ha establecido su finalidad de uso. Por tanto, la validación estará condicionada por las variables que pueden afectar a la realización, por el objetivo y por la finalidad de uso del método.

Existen tres categorías de variables que pueden afectar a la realización de un ensayo y que deben tenerse en cuenta en las validaciones (OIE, 2006a):

- a. **Las muestras:** cada muestra presenta unas características determinadas principalmente relacionadas con el hospedador. Factores como la edad, la raza, el sexo, el estado nutricional o el estado de gestación puede afectar a la sustancia investigada, al igual que el estado inmunitario debido a vacunaciones o a infecciones. El estado de conservación de la muestra también puede afectar al resultado del ensayo, por lo que los obtenidos a partir de muestras alteradas deberán ser interpretados con suma cautela o ser descartados directamente.
- b. **El sistema de ensayo:** las condiciones de ejecución de los ensayos son básicas para garantizar su validez. Aspectos como el estado de los equipos, la calidad de los reactivos, las condiciones ambientales y el nivel de formación de los técnicos deberán estar perfectamente controlados para que el comportamiento del sistema de ensayo se ajuste a lo esperado.
- c. **El resultado de la prueba:** la capacidad del resultado del ensayo para clasificar adecuadamente a los animales investigados depende de la Se y Sp diagnóstica y de la prevalencia de la enfermedad en la población (este aspecto se discutirá más adelante). La Se y la Sp diagnóstica se calculan a partir de muestras de valor conocido. En la medida en que los animales seleccionados para la obtención de esas muestras sean representativos de la población objeto de estudio mayor será la exactitud del ensayo cuando se aplique sobre la citada población. El conocimiento de la prevalencia es esencial para la interpretación de un resultado positivo o negativo de una prueba diagnóstica tal y como indican los valores predictivos de un test.

El objetivo de un método debe establecerse previamente a la validación y permite clasificarlos en dos grandes bloques: los métodos de criba y los métodos de confirmación. Los métodos de criba se usan para el procesado rápido y fácil de un gran número de muestras y determinar por sospecha la presencia de un agente infeccioso. Deben garantizar un número reducido de falsos negativos y que esto no implique un número excesivo de falsos positivos. Por el contrario, los ensayos de confirmación tienen como objetivo la detección de

individuos positivos seleccionados previamente por los métodos de criba. Deben garantizar un nivel bajo de falsos positivos y un nivel bajo de falsos negativos con respecto al método de criba. Esta clasificación no impide que el mismo método pueda estar incluido en un bloque u otro en función de la finalidad prevista para la prueba (Jacobson, 1998).

Por último, la finalidad de uso también deberá establecerse previamente a la validación, aunque el desarrollo orientado a una determinada no implica que no tenga validez para otras. La finalidad de un método de ensayo estará entre las siguientes (OIE, 2008):

1. Demostrar que una población definida está libre de infección: históricamente, después del uso de vacunaciones o después del control de brotes de infección.
2. Garantizar que un animal está libre de una determinada infección con fines de comercio internacional.
3. Erradicación de una enfermedad en una población.
4. Confirmación de un resultado en animales sospechosos.
5. Estimar la prevalencia de una infección.
6. Determinar el estado inmunitario de los animales después de una vacunación.

La validación de un método de ensayo requiere el cumplimiento de unos requisitos generales básicos que se pueden agrupar de la siguiente forma:

- La realización de los ensayos deberá ajustarse a lo establecido en las normas de calidad, básicamente en la UNE-EN ISO/IEC 17025 o similares.
- La validación del ensayo debe ser adecuada al objetivo establecido para su uso posterior.
- Para la realización de los estudios de viabilidad es necesario disponer de un número reducido de muestras de valor conocido (con presencia y ausencia de Ac) en volumen suficiente y que fueran obtenidas y conservadas para garantizar el mayor grado de homogeneidad posible.
- El método propuesto debe permitir la obtención de resultados normalizados con respecto a los valores de las muestras control que obligatoriamente deberá incluir el método. Existen diferentes modelos de normalización de resultados (Wright y cols., 1993).

En base a estos requisitos, la OIE (2006a) establece una sistemática de validación de métodos de ensayo, previa a su puesta en uso como métodos de referencia, que incluye los siguientes apartados:

- a. La selección de un ensayo que inicialmente se supone adecuado para el fin perseguido.
- b. El diseño y elaboración del método de ensayo.
- c. Las pruebas iniciales de viabilidad y de robustez con muestras de valor conocido y establecimiento del sistema de normalización de resultados.



- d. El estudio de parámetros iniciales tales como el rango operativo lineal del ensayo, la precisión en condiciones de repetibilidad y la Se y Sp analítica.
- e. La estimación de parámetros de rendimiento básicos como son la Se y la Sp diagnóstica a partir de poblaciones de animales de referencia.
- f. La realización de pruebas de comparación con otros laboratorios para valorar el comportamiento adecuado del ensayo en condiciones de reproducibilidad.
- g. La mejora y extensión del proceso de validación mediante el uso del test en condiciones de rutina.

Este modelo de validación es aplicable a cualquier técnica diagnóstica, teniendo en cuenta las peculiaridades de cada una de ellas.

### **8.2.2 Fases de la validación de un ELISA**

La validación de un test de ELISA de nuevo desarrollo, previo a su puesta en uso, se realiza en cuatro fases que se comentan a continuación (OIE, 2008).

#### **Fase 1.- Selección de reactivos y establecimiento de las condiciones de uso**

En esta fase inicial se seleccionan los diferentes reactivos que se van a utilizar en el ensayo y se establecen las condiciones de uso con las muestras estándar seleccionadas. De esta forma se fijan las concentraciones de uso de los reactivos y las condiciones ambientales y físico-químicas del ensayo: temperatura de incubación, humedad, tiempo de incubación, pH, etc.

Una vez que se ha adecuado el uso de los reactivos se determina el rango operativo lineal del ensayo mediante diluciones seriadas de un suero altamente positivo. Se realizan pruebas de exactitud mediante el uso de estándares de referencia internacionales y frente a otros estándares internos.

En esta fase también se realizan estudios de precisión mediante la repetición de muestras dentro de una placa y entre placas de la misma serie y entre series diferentes del ensayo. Un esquema a aplicar en esta fase aparece reflejado en el tabla 11. Se calcula el coeficiente de variación (CV) de los valores obtenidos, que en esta fase preliminar deberá estar por debajo del 20%, considerándose un valor superior al 30% como inadecuado.

Finalmente se realizan estudios de Se y Sp analítica. La Sp analítica estima la capacidad del ensayo para no mostrar reacciones cruzadas con sustancias parecidas o próximas. Para su evaluación de deberán utilizar sueros procedentes de animales afectados por microorganismos próximos, sueros de animales vacunados, etc. La Se analítica estima la cantidad más pequeña de la sustancia a investigar que es capaz de detectar el test. Para su determinación se puede utilizar un suero positivo diluido un determinado número de veces y,

posteriormente se investiga cada una de ellas hasta obtener la dilución más baja que el test da como positiva.

En esencia, se puede decir que esta fase constituye la primera verificación interna del método de ensayo.

## **Fase 2.- Cálculo de la Se y la Sp diagnóstica y comparación con otros métodos de ensayo**

Los indicadores tradicionales y básicos del valor diagnóstico de un test son la Se y la Sp y, por tanto, constituyen una medida de su validez, es decir, el grado en que un test mide lo que se supone que debe medir. En su conjunto, estos indicadores miden la exactitud o capacidad diagnóstica de un test para un punto de corte (COff) determinado.

La Se es la capacidad de una prueba para clasificar a un individuo como enfermo. En términos de probabilidad condicional, la Se es la probabilidad de que una prueba clasifique como enfermo a aquellos individuos que verdaderamente lo estén.

Siguiendo el criterio anterior, la Sp es la capacidad de una prueba para clasificar a un individuo como sano. En términos de probabilidad condicional, la Sp es la probabilidad de que una prueba clasifique como sanos a aquellos individuos que verdaderamente lo estén. A partir de estos parámetros se calculan otros como pueden ser los valores predictivos positivos y negativos.

Para su estimación se debe disponer de muestras de valor conocido procedentes de las poblaciones sobre las que posteriormente se aplicará el test. El tipo de muestras utilizadas para los test de ELISA son los sueros. Serán lo más representativas posible de la población objeto de estudio y el número de ellos se estimará previamente estando afectado por el nivel de confianza estimado para el cálculo de la Se y la Sp y por el error máximo admitido en su estimación. Una vez seleccionado es necesario conocer su situación con respecto a la infección correspondiente. La más frecuente es investigarlos con otros métodos perfectamente validados, los denominados “gold standard”, que además servirán de referencia para la validación del nuevo método.

Otro aspecto importante es el COff del nuevo test, cuya variación permite modificar su Se y Sp. Esta circunstancia permite optimizar el test al objetivo y a la finalidad prevista. Por ejemplo, los ensayos de cribado tienen una alta Se mientras que los de confirmación tienen una alta Sp.

**Tabla 11. Estimación de la precisión preliminar en la validación de un método en condiciones de repetibilidad y de repetibilidad intermedia (Propuesto por Jacobson, 1998)**

A. Relación de sueros propuestos, como mínimo: un positivo fuerte, un positivo débil y un negativo.

- Suero positivo A (fuerte)
- Suero positivo B (fuerte o intermedio)
- Suero positivo C (intermedio)
- Suero positivo D (débil)
- Suero negativo E

B. Ensayo para la estimación de la precisión intra y entre placas, en condiciones de repetibilidad, para una serie de ensayos de un test que incluya 4 placas iguales como la del ejemplo siguiente. El total de resultados obtenidos para cada muestra será de 16. Estos resultados también pueden servir para evaluar la exactitud del método si las muestras utilizadas son estándares de referencia.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A	A	A	A								
B	B	B	B	B								
C	C	C	C	C								
D	D	D	D	D								
E	E	E	E	E								
F												
G												
H												

C. Ensayo para la estimación de la precisión, en condiciones de repetibilidad intermedia, para varias series de ensayos de un test mediante el análisis en el mismo laboratorio de la placa anterior entre 10 y 20 veces y en diferentes días y con diferentes operarios. El total de resultados obtenidos estará comprendido entre 40 y 80. Estos resultados también pueden servir para evaluar la exactitud del método si las muestras utilizadas son estándares de referencia.

D. Análisis de los valores obtenidos

Se consideran valores iniciales adecuados cuando en las series de la mayor parte de las muestras investigadas no sobrepasan el 20% CV

**Observaciones:**

En condiciones de de repetibilidad, los ensayos se realizan en el mismo laboratorio, por los mismos operarios, con los mismos equipos y en períodos de tiempo cortos, generalmente en el mismo día.

En condiciones de repetibilidad intermedia, los ensayos se realizan en el mismo laboratorio, pero variando lo máximo posible a los operarios y a los equipos y realizándolos en días diferentes.

**Fase 3.- Análisis de la reproducibilidad del test**

Previo al uso de un test en condiciones reales es necesaria una estimación de su reproducibilidad mediante la realización de ensayos interlaboratorio con alícuotas de las mismas muestras. Durante la realización de estas pruebas, los laboratorios participantes llevarán a cabo estudios de repetibilidad para la estimación de la precisión y de la exactitud del método mediante repeticiones de muestras de valor conocido como pueden ser los controles del test. El número de laboratorios participantes puede ser variable, pero no inferior a tres. Una vez que esté seleccionado el grupo de participantes se les distribuirá un panel de muestras idéntico que se investigará en cada uno de ellos. El panel de muestras no deberá de ser inferior a 20.

Los datos obtenidos en cada laboratorio serán evaluados con el conjunto de resultados, estimándose la concordancia entre los resultados de cada uno de ellos en

relación a la media ( $M$ ), a la desviación estándar ( $SD$ ) y al rango de valores obtenidos por el conjunto de participantes.

#### **Fase 4.- Aplicación del test en condiciones reales**

El objetivo final de un test es su uso en condiciones reales, siendo en esta etapa en la que se determina su verdadera utilidad según los logros obtenidos en el control de la enfermedad investigada: cálculo de prevalencias, control de movimiento, erradicación, etc.. Por otro lado, es fundamental la interpretación adecuada de los resultados para lo que es imprescindible conocer la prevalencia de la enfermedad en cuestión dentro de la población objeto de estudio y la  $Se$  y/o la  $Sp$  del test, para poder evaluar sus valores predictivos, es decir, la validez de los resultados de la prueba.

Finalmente, la realización de estudios posteriores con otras muestras de valor conocido, en diferentes áreas o zonas, permitirá mejorar y extender la validación del test a lo largo del tiempo y conocer su comportamiento en múltiples y variadas condiciones.

### **8.2.3 Tipos de muestras necesarias para la validación de un ELISA**

La validación de un método implica el uso de dos tipos de muestras: los estándares o patrones y las muestras procedentes de animales de referencia. Cada uno de estos tipos se utilizarán para finalidades diferentes. A continuación se exponen las características básicas de cada uno de ellos.

#### **8.2.3.1 Estándares de referencia**

Los patrones o estándares de referencia internacional sirven para calibrar el intervalo o rango de medida y la  $Se$  analítica de los métodos de ensayo de referencia, de esta forma los ensayos calibrados con respecto a éstos, presentarán una  $Se$  y una  $Sp$  diagnóstica similar entre todos ellos o, en su defecto, se podrá estimar el grado de discrepancia que pueda existir entre métodos de ensayo similares. Estos estándares están constituidos por sueros libres de hemólisis y procedentes de animales con una carga microbiana conocida y, en cualquier caso, de animales libres de patógenos específicos. Cuando se habla de estándar de referencia internacional se hace referencia a un estándar primario con respecto al cuál se comparan y calibran todos los demás. Los laboratorios de referencia de cada país elaboran con respecto al anterior un estándar de referencia secundario y a partir de éste se elaboran los estándares de trabajo que estarán en cantidad suficiente para poder utilizarse en los ensayos de rutina por los laboratorios de diagnóstico. Esto permitirá garantizar que los resultados de cada placa de trabajo sean coherentes con el valor del estándar de referencia primario y con los obtenidos por el método de referencia (OIE, 1998).

Los animales utilizados para la obtención de estándares internacionales presentarán una respuesta típica al microorganismo en cuestión y deberá ser inducida por medio de una infección experimental o por inmunización evitándose la obtención de sueros procedentes de animales con infección natural. En este último caso no se puede conocer cuál es la situación exacta del animal con respecto a la enfermedad: período de incubación, dosis infectiva o vía de entrada del agente, entre otros aspectos de especial relevancia. El control negativo (CN) procederá de animales que nunca hayan estado en contacto con el microorganismo en cuestión y que no se hubiesen inmunizados anteriormente.

En general, para las pruebas de diagnóstico por ELISA se establecen tres estándares primarios de referencia: un positivo fuerte, un positivo débil y un negativo (OIE, 1998). En el supuesto de que no estén disponibles, lo que ocurre para la mayoría de las enfermedades, el laboratorio de diagnóstico deberá elaborar unos propios que por lo menos le servirán para garantizar la coherencia entre todos sus ensayos.

Los estándares primarios se utilizarán sin diluir, si bien en algún caso será necesaria una única dilución para conseguir que la actividad del suero esté dentro de los límites de detección del test correspondiente, en este caso el ELISA. El estándar fuerte se usa para determinar el límite superior de la prueba y el estándar débil para determinar el límite de detección y la Se analítica. El estándar negativo se usa para dilución de los positivos y como control paralelo de los positivos en la realización de los ensayos.

La obtención de estándares es un proceso complejo en el que se pueden diferenciar dos etapas: una de selección de muestras con actividad de Ac para las positivas y sin actividad para las negativas y otra de estimación de la dilución más adecuada de uso. Para la selección de muestras de actividad conocida, los sueros candidatos a estándar deberán proceder de animales con un estado conocido a la infección. Las muestras positivas procederán de animales en los que se ha verificado la presencia de la enfermedad mediante aislamiento, o detección de ácidos nucleicos, y se puede constatar la presencia de Ac específicos por métodos basados en las reacciones Ag-Ac. Los candidatos a estándares negativos, cuyo suero se utilizará para la dilución de los positivos, procederán de animales en los que se pueda garantizar que están libres de la enfermedad, que no presenten Ac de infecciones naturales pasadas o de inmunizaciones y que estén libres de Ac frente a microorganismos próximos responsables de respuestas serológicas cruzadas. Además, deberán generar resultados negativos a los test basados en las reacciones Ag-Ac disponibles y cuando sean investigados a los ELISAs deberán presentar un “ruido de fondo” lo suficientemente bajo como para que puedan ser clasificados inequívocamente como negativos. Generalmente se seleccionarán de poblaciones de las que se conoce que están libres de la enfermedad a lo largo de años por controles sistemáticos, por la falta de evidencias clínicas, etc. Es preferible que proceda de una mezcla de sueros para evitar que alguna particularidad de

uno de ellos en concreto pueda originar variaciones en el “ruido de fondo” según el laboratorio (OIE, 2008).

Las muestras seleccionadas para estándares deben presentar una respuesta tipo frente a la infección. Es difícil definirla, pero en general sería el comportamiento de un suero en lo referente a la actividad de los Ac generados frente a una infección determinada que representa la respuesta media a esa infección en los hospedadores susceptibles y, por tanto, su composición de Ac se corresponde con la respuesta inmunitaria humoral típica del hospedador en relación al microorganismo. Ahora bien, la composición y la cantidad de Ac en el suero de un individuo podrá afectarse por diferentes factores, muchos de ellos de carácter individual (sexo, raza, edad, estado inmunitario, etc) que dificultan enormemente la definición de las características de una respuesta tipo. Las muestras negativas también presentarán una composición normal y característica de la mayoría de los individuos de la población y sin reacciones cruzadas con agentes próximos (OIE, 2008).

Una forma de evaluar la respuesta tipo de un suero se consigue mediante las curvas de perfil dosis/respuesta. Cuando muestras positivas a un determinado Ac se diluyen en razón dos un número de veces determinado en un suero negativo y se investigan con un test de ELISA (garantizando que las más bajas den un resultado inequívocamente negativo) representando en una gráfica los valores de las diluciones en las abscisas y los valores de absorbancia en las ordenadas, se obtiene una curva de titulación de tipo sigmoideo característica. La curva correspondiente al ELISAI presenta una pendiente más suave y hacia la derecha y la correspondiente al ELISAc presenta una pendiente hacia la izquierda y mucho más acusada que la primera, lo que dificulta, como veremos posteriormente, el cálculo de la dilución de uso del estándar débil (Wright y cols., 1993).

Las diluciones de cada suero se ensayarán mediante réplicas, en el mismo día y en distintos días, para obtener una curva de perfil dosis/respuesta media en todo el rango de detección del ELISA. La representación gráfica de las curvas de los sueros y el cálculo de los coeficientes de regresión permite seleccionar el suero o los sueros que mejor se ajusten a una respuesta determinada, preferiblemente en el rango medio de la gráfica (Wright y cols., 1997).

Después de seleccionar el suero o mezcla de sueros estándar es necesario estimar su dilución de uso correspondiente a un determinado nivel de actividad. Lo más adecuado es seleccionar las diluciones correspondientes a la zona lineal de la curva sigmoidea de dosis/respuesta. El suero positivo fuerte presentará una actividad de Ac justo por debajo de la fase de meseta en el ELISAI que corresponde con el 100% de positividad. En el ELISAc los Ac de este suero serán suficientes para producir la máxima reacción que corresponda a los límites seleccionados de la prueba, en este caso un 100% de inhibición. Estos controles se utilizan posteriormente para normalizar los

resultados brutos. El suero positivo débil, obtenido por dilución del positivo fuerte, presentará un resultado inequívocamente positivo por encima del umbral positivo/negativo. De igual forma el suero negativo presentará una reacción inequívocamente negativa a la prueba (Wright, 1998).

Los criterios para definir el valor del estándar positivo débil en ambos ELISAs es diferente debido al comportamiento de la zona lineal de la curva dosis/respuesta. En el ELISAI el número de diluciones que contiene es más elevado que en el caso del ELISAc por lo que resulta más fácil la obtención de la dilución de uso. Para el ELISAI si el estándar positivo fuerte presenta un porcentaje de positividad (PP) del 100%, el positivo débil presentará un PP del 50% y el negativo un PP por debajo del 20%. En el caso del ELISAc el estándar positivo fuerte presentará un porcentaje de inhibición (PI) del 100% con respecto al Ac competidor, el estándar positivo débil presentará un PI entre el 50 y el 75% con respecto a este Ac y el estándar negativo un PI por debajo del 50% siendo la reacción siempre inequívocamente negativa (Wright, 1998).

### 8.2.3.2 Muestras obtenidas de animales de referencia

#### Tamaño de la muestra para el cálculo del rendimiento de los test de diagnóstico

El primer paso para estimar adecuadamente los parámetros de rendimiento de un test es disponer de un tamaño de muestra adecuado al estudio a realizar. El cálculo del tamaño de la muestra está influenciado en primer lugar por la precisión de la estimación y, en general, se cumple que al aumentar la precisión (o lo que es lo mismo, al disminuir el grado de error admisible) aumenta el tamaño de muestra necesario. Igualmente, para una precisión dada un aumento del nivel de confianza determina un aumento del tamaño de la muestra. Por último, el tamaño de la muestra también se verá afectado por la Se y la Sp que se le asignen en principio a la prueba y por la relación de sanos/enfermos en la muestra o por la prevalencia de la enfermedad en la población (Jacobson, 1998).

El tamaño de la muestra de cada grupo de animales de referencia necesarios para la validación de un método se obtiene de la siguiente fórmula:

$$n = \frac{(X)(1-X)(C^2)}{e^2}$$

$X$  = Se o Sp diagnóstica, en función del grupo estimado

$C$  = Intervalo de confianza (95% corresponde a 1,96 equivalente a  $\pm 2\sigma$ )

$e$  = Error expresado en forma decimal

Jacobson en 1998, tabla 12, recomienda que el rendimiento diagnóstico del ensayo objeto de estudio sea estimado de forma modesta el número de muestras. Para la estimación de la Se unos criterios aceptables serían los siguientes: 92% de Se diagnóstica, 2% de error admisible y un intervalo de confianza del 95%. Para el cálculo de la Sp, en principio se pueden aplicar los mismos criterios que para la Se, pero las variables biológicas susceptibles de facilitar la aparición de falsos positivos son mucho mayores que las susceptibles de originar falsos negativos, por lo que es recomendable que la Sp estimada del test sea baja, por este motivo el número de muestras negativas debería estar entre las 1.000 y las 5.000.

**Tabla 12. Número de muestras de animales de referencia teóricamente necesario para validar un ensayo. (extractato de Jacobson, 1998)**

Se o Sp de diagnóstico estimadas (%)	Margen de confianza (%)			
	85	90	95	99
80	845	1.084	1.536	2.654
86	636	816	1.156	1.997
90	475	610	864	1.493
92	389	499	707	1.221
94	298	382	542	935
95	251	322	456	788
96	203	260	369	637
97	154	197	279	483
98	103	133	188	325
99	52	67	95	164

Porcentaje de error admitido en la estimación de la Se o la Sp diagnóstica = 0,02. (Nota: una disminución del error implicará siempre un aumento en el número de muestras).

### Selección de animales de referencia y criterios de comparación

Para el cálculo de la Se y de la Sp diagnóstica se deberá disponer de un grupo de animales de referencia con un estado infectivo conocido, positivas para el cálculo de la Se y negativas para el cálculo de la Sp (OIE, 2006a). Estas muestras deberían ser representativas de toda la población en relación a todas las variables biológicas susceptibles de afectar al resultado del ensayo: edad, sexo, raza, etc. Resulta evidente que la posibilidad de disponer de estas muestras es mucho más fácil para el grupo de animales negativos que para el grupo de animales positivos, si bien en



poblaciones vacunadas o con alta prevalencia a una determinada enfermedad, esto puede resultar más difícil que obtener representación de animales positivos. En más de una ocasión es necesario recurrir a muestras de animales procedentes de regiones geográficas lejanas lo que puede originar una estimación errónea de los parámetros de rendimiento al no considerar características particulares de los animales sobre los que se va a aplicar el ensayo.

En la estimación de los parámetros de rendimiento también resulta de especial relevancia la finalidad del test y la enfermedad objeto de investigación. Si el test está destinado a su uso en el diagnóstico de una enfermedad grave y muy contagiosa, como puede ser la fiebre aftosa, el test debe garantizar una Se muy elevada, incluso a costa de descender significativamente la Sp. En sentido contrario, si la enfermedad es poco grave se tiende a utilizar ensayos más específicos para evitar la aparición de muchos falsos positivos, por el mismo motivo son los seleccionados para pruebas de confirmación.

Básicamente existen dos opciones para evaluar el estado sanitario de los animales seleccionados: los métodos de referencia y los métodos relativos. Los métodos de referencia se utilizan como criterio de comparación absoluto. Son métodos que permiten garantizar sin ningún género de dudas que el animal está afectado por la enfermedad en cuestión. Los más importantes son el aislamiento y el estudio anatomopatológico de lesiones patognomónicas. Estos métodos tienen dos inconvenientes principales: presentan una baja Se siendo difícil obtener muestras de animales recién infectados o en los primeros estadios de la enfermedad y no pueden ser aplicables a las poblaciones de animales negativos por el elevado coste de aplicación. En este último caso, se suele recurrir a la selección de animales procedentes de áreas geográficas en las que no existen evidencias de la enfermedad, no hay animales vacunados, no hay signos clínicos en las explotaciones seleccionadas ni evidencia de Ac por controles realizados en años anteriores sobre esos animales (Jacobson, 1988).

Cuando no se dispone de un número suficiente de animales con el estatus sanitario confirmado por métodos de referencia se puede optar por el uso de otros métodos menos exactos. En este caso estaremos ante un criterio de comparación relativo. Los métodos elegidos en este caso, únicos o en combinación, permiten clasificar previamente a los animales seleccionados en positivos o negativos, aunque no existen garantías absolutas de que la clasificación sea correcta. El principal inconveniente de este sistema es que se traslada a la evaluación del nuevo método los sesgos que presente el método relativo de comparación (Jacobson, 1998).

En más de una ocasión se ha recurrido a la utilización de animales infectados experimentalmente o a animales vacunados, sobre todo mediante la toma secuenciada de muestras de animales individuales. En este caso se habla de un

criterio de comparación accesorio. Las muestras obtenidas por este criterio son las menos adecuada para evaluar los parámetros de rendimiento de un test de ensayo por dos motivos principales. En primer lugar, la evolución de los Ac en este tipo de animales puede no corresponder con lo acontecido en las infecciones naturales. En segundo lugar, la toma de muestras en distintas etapas antes y después de la vacunación o de la infección experimental no se corresponde con el criterio de observaciones independientes, necesarias desde el punto de vista estadístico. Sin embargo, la utilización de este tipo de muestras es muy interesante para evaluar los diferentes tipos de Ig detectadas por el test (IgM, IgG, IgA) o para evaluar la Sp del test con respecto a la existencia de Ac vacunales o naturales en una población (Jacobson, 1988).

#### 8.2.4 La estimación del rendimiento de los test de diagnóstico

El rendimiento de un test se conoce estimando determinados parámetros. Éstos son requisitos que deben cumplir los test diagnósticos para su uso en situaciones epidemiológicas determinadas y para una finalidad concreta, y sirven para estimar la magnitud de los errores o de los aciertos, que se cometen con un test determinado al intentar establecer un diagnóstico a partir de los resultados obtenidos después de la realización de la prueba.

Para su estimación se suele recurrir al uso de tablas de 2x2 que clasifican a los animales en positivos y negativos tanto por el método en estudio como por el método de comparación utilizado. El esquema a aplicar para el cálculo de los parámetros de rendimiento es el indicado en la tabla 13.

Tabla 13. Comparación de "gold standard" y test.

		Gold standard (Método de comparación)		
		+	-	
Test en estudio	+	VP a	FP b	m <sub>1</sub>
	-	FN c	VN d	m <sub>2</sub>
		n <sub>1</sub>	n <sub>2</sub>	T

n<sub>1</sub>: enfermos  
 n<sub>2</sub>: no enfermos  
 m<sub>1</sub>: test positivos  
 m<sub>2</sub>: test negativos  
 T: total de muestras  
 VP y a: verdaderos positivos  
 FN y c: falsos negativos  
 FP y b: falsos positivos  
 VN y d: verdaderos negativos

En las tablas de 2x2 se establecen cuatro categorías de resultados en relación al test que se está evaluando:

- Verdaderos positivos (VP): número de animales positivos que el test clasifica como positivos siendo verdaderamente positivos
- Verdaderos negativos (VN): número de animales negativos que el test clasifica como negativos siendo verdaderamente negativos
- Falsos negativos (FN): número de animales que el test clasifica como negativos cuando en realidad son positivos
- Falsos positivos (FP): número de animales que el test clasifica como positivos cuando en realidad son negativos

#### **8.2.4.1. Sensibilidad y especificidad analítica**

Previo a la estimación de la Se y la Sp diagnóstica es conveniente estimar los parámetros analíticos del nuevo método. La Se analítica hace referencia a la menor cantidad de Ac que es capaz de detectar un test y se puede obtener mediante una dilución de punto final de una muestra de valor conocido, preferentemente un estándar de referencia. Una mayor Se analítica no presupone una mejor Se diagnóstica de un test sobre otro, pero si facilita el establecimiento del COff positivo/negativo, sobre todo en el caso de enfermedades para las que no esté disponible un estándar de referencia. El objetivo de su estimación es para conocer el rango posible de detección del método (OIE, 2006a).

La Sp analítica guarda relación con la capacidad de un test para discernir entre Ac específicos frente al agente en cuestión y frente a aquellos procedentes de microorganismos con los que puede presentar reacciones cruzadas. La no detección de estos Ac o una detección a niveles altos y no bajos puede ser determinante a la hora de definir la finalidad de un test o simplemente rechazarlo para diagnóstico. Generalmente, la obtención de muestra para evaluar la existencia de reacciones cruzadas sólo es posible por medio de infecciones experimentales (OIE, 2006a).

#### **8.2.4.2. Sensibilidad y especificidad diagnóstica**

La validez de un test diagnóstico es el grado en que mide lo que se supone que tiene que medir. Los parámetros que mejor la estiman son la Se y la Sp. Para el cálculo de estos parámetros se utiliza una tabla de 2x2 similar a la de la tabla 13. Estos parámetros se pueden estimar mediante dos métodos de comparación. El primero consiste en evaluar el resultado que se obtiene con un test al investigar animales de los que se conoce su situación sanitaria inequívocamente por otro test, método de referencia de comparación. El segundo consiste en comparar el resultado de un test con el

resultado obtenido sobre los mismos animales con otro u otros test que no garantizan inequívocamente su situación sanitaria, método relativo de comparación (Jacobson, 1998).

La Se mide la capacidad de un test para clasificar como positivos los que verdaderamente lo son. También es la probabilidad de que un test clasifique como positivo un animal que lo sea o la probabilidad de que un test clasifique como positivo un animal enfermo (Epidat 3.1, 2005). Como mide la fracción de verdaderos positivos con respecto al total de positivos reales la Se también se conoce como “fracción de verdaderos positivos” y se calcula según la siguiente fórmula:

$$Se = \frac{a}{a + c} = \frac{VP}{VP+FN}$$

De forma análoga, la Sp mide la capacidad de un test para clasificar como negativos los que verdaderamente lo son. También es la probabilidad de que un test clasifique como negativo un animal que lo sea o la probabilidad de que un test clasifique como negativo un animal sano (Epidat 3.1, 2005). Como mide la fracción de verdaderos negativos con respecto al total de negativos reales la Sp también se conoce como “fracción de verdaderos negativos” y se calcula según la siguiente fórmula:

$$Sp = \frac{d}{b + d} = \frac{VN}{FP+VN}$$

Las pruebas sensibles son las más adecuadas para utilizar en ensayos de cribado ya que se pretende evitar los falsos negativos. Por el contrario, las pruebas específicas son las elegidas como pruebas de confirmación precisamente para que no den falsos positivos.

Estos parámetros no dependen de la prevalencia de la enfermedad en la población en estudio y son característicos del test. Sin embargo, si depende del COff asignado a la prueba (Doménech, 2004). También dependen de la situación real del individuo investigado, pero cuando los test se utilizan en poblaciones en las que se desconoce esta situación (caso por ejemplo de una campaña de erradicación) estos parámetros no aportan información suficiente sobre el comportamiento del test (Epidat 3.1, 2005).

### 8.2.4.3. Valor predictivo positivo y negativo

Siguiendo con el punto anterior, es necesario definir unos parámetros que estimen la seguridad de una prueba diagnóstica cuando se usa en un determinado contexto clínico y epidemiológico. Cuando se realiza una prueba diagnóstica se desconoce la situación verdadera del individuo con respecto a la enfermedad y la pregunta que se plantea es la siguiente: ¿cuál es la probabilidad de que el individuo esté realmente enfermo o realmente sano?. Esta estimación es el objetivo de los valores predictivos.

El valor predictivo positivo (VPP) es la probabilidad condicional de padecer la enfermedad si se obtiene un resultado positivo al test. Este valor puede calcularse a partir de la proporción de pacientes con un resultado positivo en el test y que finalmente resultaron padecer la enfermedad (Epidat 3.1, 2005). El VPP se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$\text{VPP} = \frac{a}{a + b} = \frac{\text{VP}}{\text{VP} + \text{FP}}$$

El valor predictivo negativo (VPN) es la probabilidad condicional de estar sano si se obtiene un resultado negativo y, análogamente al anterior, será la proporción de individuos con resultado negativo en el test que finalmente no resultaron padecer la enfermedad (Epidat 3.1, 2005). El VPN se calcula por la siguiente fórmula:

$$\text{VPN} = \frac{d}{c + d} = \frac{\text{VN}}{\text{FN} + \text{VN}}$$

La principal limitación de los valores predictivos es que dependen de la prevalencia de la enfermedad en la población. En esencia cuando la prevalencia de la enfermedad es baja en la población un resultado negativo es prácticamente definitivo en el sentido de que el animal está sano, sin embargo un resultado positivo da muy pocas garantías de que el animal esté verdaderamente enfermo. En sentido contrario, cuando la prevalencia de la enfermedad es alta la proporción de falsos positivos es baja y la validez del resultado positivo muy elevada, es decir, del VPP (Doménech, 2004).

### 8.2.4.4. Valor global, concordancia, eficiencia o índice de validez

Este parámetro pretende englobar en uno sólo los valores predictivos. Denominado también como Índice de Validez se define como la proporción total de

individuos clasificados correctamente. Se calcula según la siguiente fórmula (Doménech, 2004):

$$\text{Eficiencia} = \frac{a + d}{T} = \frac{VP + VN}{\text{Total de individuos}}$$

Su principal limitación es que también depende de la prevalencia de la enfermedad en la población en estudio.

#### 8.2.4.5. Razón de verosimilitud

Para corregir las limitaciones de los valores predictivos debido al efecto de la prevalencia se han ideado otros parámetros de los cuales el más significativo es la razón de verosimilitud (RV), razón de probabilidad, cociente de probabilidad likelihood ratio, en inglés. Este parámetro mide cuánto más probable es un resultado determinado (positivo o negativo) según que el individuo este o no afectado por la enfermedad. Relaciona la Se y la Sp en un único indicador y su valor no depende de la prevalencia de la enfermedad (Epidat 3.1, 2005).

La RV proviene del teorema de Bayes y se puede concluir que  $RV = \text{odds post-prueba} / \text{odds pre-prueba}$ . Una *odds ratio* se refiere a la probabilidad de que un fenómeno ocurra dividido por la probabilidad de que no ocurra. Matemáticamente se expresa:

$$\text{odds} = \frac{\text{Probabilidad}}{1 - \text{Probabilidad}} = \frac{\text{Probabilidad de que ocurra}}{\text{Probabilidad de que no ocurra}} = \frac{\text{Probabilidad de un resultado particular en individuos con la enfermedad}}{\text{Probabilidad del mismo resultado en individuos sin la enfermedad}}$$

La RV+ es el cociente entre la probabilidad de un resultado positivo en los individuos enfermos (la Se) y la probabilidad de un resultado positivo en los individuos sanos (los falsos positivos). La fórmula utilizada para su cálculo es la siguiente:

$$RV+ = \frac{Se}{1 - Es} = \frac{\text{Verdaderos positivos}}{\text{Falsos positivos}} = \frac{\text{Probabilidad de resultado positivo en individuos con la enfermedad}}{\text{Probabilidad de un resultado positivo en individuos sin la enfermedad}}$$

$$\text{odds post-prueba} = (RV+) \times \text{odds pre-prueba}$$

De la misma forma, la RV- es el cociente entre la probabilidad de un resultado negativo en un individuo enfermo (los falsos negativos) y la probabilidad de un resultado negativo en un individuo sano (la Sp). La fórmula utilizada para su cálculo es la siguiente:

$$RV- = \frac{1 - Se}{Es} = \frac{\text{Falsos negativos}}{\text{Verdaderos negativos}} = \frac{\text{Probabilidad de un resultado negativo en individuos con la enfermedad}}{\text{Probabilidad de un resultado negativo en individuos sin la enfermedad}}$$

$$\text{odds post-prueba} = (RV-) \times \text{odds pre-prueba}$$

Cuanto más alto sea el valor de RV+, mejor será la prueba para diagnosticar una enfermedad determinada. Por el contrario, cuanto más bajo sea el valor de la RV- mejor será la prueba para excluir la enfermedad. Si el valor de la RV para un resultado positivo o negativo es 1 significa que la prueba no aporta ninguna información. Sin embargo, cuanto más se aleje de 1 más información suministrará. Como regla general, son útiles clínicamente las pruebas con RV+ mayor de 10 y con RV- menor de 0,1. En la tabla 14 se indica el valor aproximado de la información suministrada por el resultado de un test en función de la RV.

Una RV+ mayor de 10 significa que la *odds ratio* de la enfermedad es 10 veces mayor después de la prueba o, dicho en otras palabras, por cada 10 veces que la prueba sea positiva en los pacientes con la enfermedad (numerador), es positiva en un paciente sin la enfermedad (denominador).

La RV- valora la contribución de un resultado negativo en la “no confirmación” de la enfermedad. Se mueve en una escala inversa a la RV+. Para una interpretación similar a la RV+ y poder ser comparada con ésta se puede definir al revés (Es/1-Se) y entonces establece la relación entre la ventaja preprueba de no enfermedad y la ventaja postprueba de un resultado negativo. De esta forma se puede comparar con la RV+ y se interpreta igual, pero para los resultados negativos (Delgado y Llorca, 2002).

Las RV de un ensayo con múltiples resultados continuos se evalúan mediante las curvas ROC (*Receiver Operating Characteristic Curve*).

Tabla 14. Guía aproximada para interpretación de la RV. (Hospital Ramón y Cajal, 2009)

<i>RV +</i>	<i>RV-</i>	<i>Información suministrada</i>
VP>10	VP<0,1	amplia
5<VP<10	0,1<VP<0,2	moderada
2<VP<5	0,2<VP<0,5	pequeña
1<VP<2	0,5<VP<1	insignificante

### 8.2.4.6. Curvas ROC

Las curvas ROC dan una media global de la exactitud de una prueba diagnóstica. Para su elaboración se calcula la Se y la fracción de falsos positivos (1-Sp) para todos los puntos de corte posibles. La Se se representa en el eje de las “Y” y en el eje de las “X”, 1-Sp. Cuanto más se acerque la curva al extremo superior izquierdo mayor será la exactitud global del test (figura 15). El valor del área obtenida por debajo de la curva (AUC, abreviatura de la expresión en inglés “area under curve”) es igual a la exactitud global del test. El valor de la AUC puede variar entre 0,5 y 1 (Doménech, 2004):

- Para un valor de 1: la técnica tendría una Se y una Sp perfecta y clasificaría de forma correcta a todos los individuos investigados.
- Par un valor de 0,5: la técnica sería una prueba sin valor diagnóstico y clasificaría a los individuos de forma totalmente aleatoria en positivos o negativos.

El AUC se puede definir como la probabilidad de clasificar correctamente dos individuos, sanos y enfermos, extraídos al azar de la población, mediante los resultados obtenidos al aplicarles la prueba diagnóstica. Por ejemplo, una AUC de 0,90 obtenida para un ELISA significa que un individuo enfermo extraído al azar de la población estudiada tiene un 90% de probabilidad de que su DO sea superior al COff en relación a que ese valor de DO lo presente un individuo sano extraído de la misma población (Doménech, 2004).

El AUC también sirve para comparar distintos test, siempre que se apliquen a los mismos animales y en el mismo momento. A mayor valor de la AUC mayor será la exactitud del test. Si se representan varias curvas en la misma gráfica se puede evaluar de forma visual cuál de ellos es más exacto (Doménech, 2004).

Además de valorar la exactitud, las curvas ROC también se pueden utilizar para determinar el COff más adecuado según el objetivo y la finalidad de uso del test con la modificación de la Se y la Sp (figura 16).

Figura 15. Tipos de curvas ROC

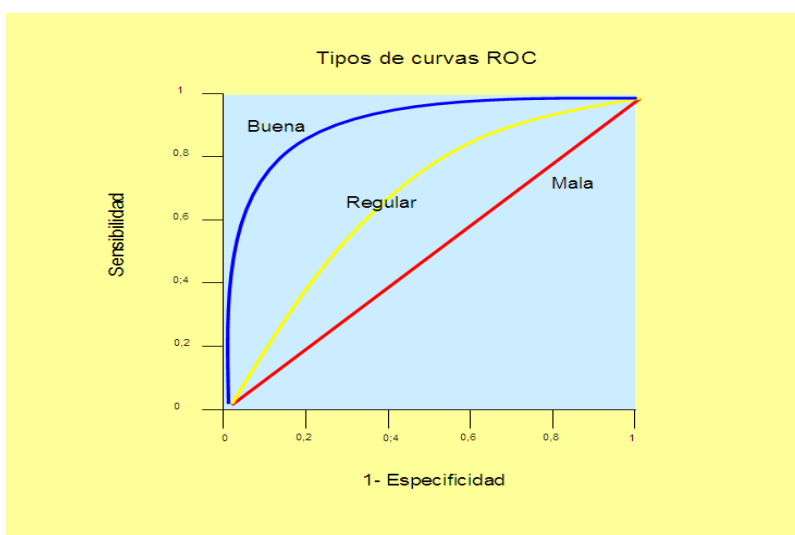
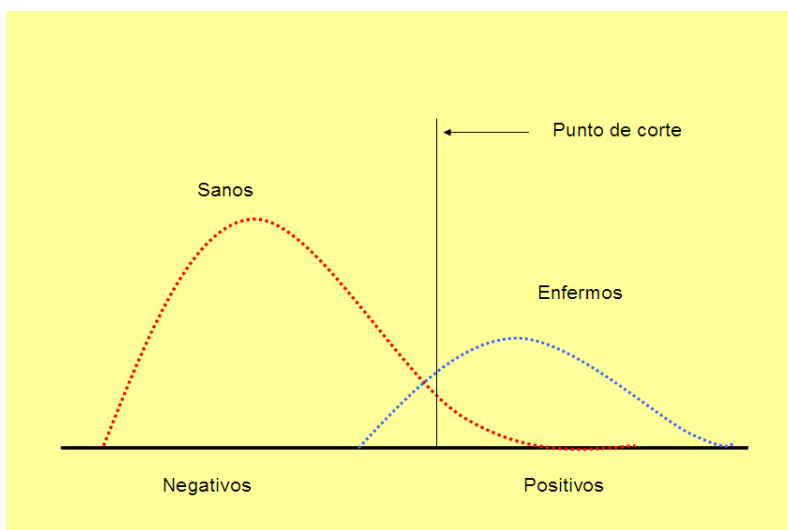




Figura 16. Variación de la Se y la Sp según el COff



#### 8.2.4.7. Índice de Youden (IY)

Refleja la diferencia entre la tasa de verdaderos positivos y la de falsos positivos. Teóricamente es igual a 1 cuando la prueba diagnóstica es perfecta ( $Se + Sp = 2$ ), por lo que los test con mejor comportamiento serán los que tengan un valor próximo a éste. Su inconveniente estriba en que no se puede establecer si el test es bueno en Se o en Sp. Por ejemplo para un valor del índice de 0,55 la Se puede ser de 0,95 y la Sp de 0,60 o viceversa (Epidat 3.1, 2005).

Su fórmula de cálculo es la siguiente:

$$IY = Se + Sp - 1 = Se - (1 - Sp)$$

#### 8.2.4.8. Índice Kappa

Permite valorar el grado de acuerdo o concordancia entre las diferentes valoraciones obtenidas sobre un mismo aspecto por diferentes observadores, instrumentos o, como en este caso, test de diagnóstico. Este índice está especialmente indicado para valorar un mismo aspecto en situaciones diferentes con respuestas categóricas (Hospital Ramón y Cajal, 2009). En este caso, el aspecto a valorar es la presencia o no de *Ac* frente a *B. abortus*, obtenido por diferentes test que clasifican a los individuos en dos categorías (positivo/negativo).

Test B	Test A		TOTAL
	Positivo	Negativo	
Positivo	A	B	A + B
Negativo	C	D	C + D
TOTAL	A + C	B + D	N

$$Kappa = \frac{\text{Proporción de resultados iguales} - \text{Proporción de resultados iguales debido al azar}}{\text{Proporción máxima de concordancia no debida al azar}} = \frac{((A + D) / N) - PE}{1 - PE}$$

- Proporción de resultados iguales (Acuerdo observado o Índice de concordancia):

$$\text{Proporción de resultados iguales} = \frac{\text{Suma de casos en los que hubo acuerdo}}{\text{Total de casos investigados}} = \frac{A + D}{N}$$

- Proporción de resultados iguales debido al azar o proporción de acuerdo esperado por azar (PE):

$$PE = \left( \frac{(A+B)}{N} \times \frac{(A + C)}{N} \right) + \left( \frac{(C + D)}{N} \times \frac{(B + D)}{N} \right)$$

Para el cálculo de PE se debe de considerar que los sucesos de clasificar como positivos y negativos a los individuos de la población por los test se trata de sucesos independientes. Si se considera que la probabilidad de que ocurran dos sucesos simultáneamente es la probabilidad del conjunto intersección, se cumple para sucesos independientes:  $p(A \cap B) = p(A) \times p(B)$ . En consecuencia, el primer paréntesis para el cálculo de PE es la probabilidad de que los test clasifiquen a los individuos como positivos, siendo éstos sucesos independientes; el segundo paréntesis es igual, pero para los individuos negativos.

- Proporción de concordancia descontado el azar (Conformidad esperada menos azar):

$$\text{Proporción de concordancia descontado el azar} = \frac{(A + D)}{N} - PE$$

- Proporción máxima de concordancia no debida al azar (Máxima conformidad no debida al azar):  $= 1 - PE$

$$\text{Proporción máxima de concordancia no debida al azar} = 1 - PE$$

Por tanto, el índice *Kappa* se puede definir como el cociente entre la proporción observada de resultados iguales, descontado el azar, y la máxima proporción de

concordancia no debida al azar. Si la proporción de acuerdo observado es igual a la proporción de acuerdo esperado por azar, la diferencia entre ambas es igual a cero, por lo que el grado de concordancia será atribuible enteramente al azar. Por el contrario, si la diferencia es mayor de cero, indicaría que el grado de acuerdo es mayor que el esperado si fuera enteramente atribuible al azar (Hospital Ramón y Cajal, 2009).

Este índice no indica si un método es mejor que otro en relación al número de animales clasificados correctamente según la presencia o no de *Ac* frente a *Brucella* spp., pero es indicativo del grado de acuerdo entre los test a la hora de clasificar a los animales. La interpretación de los valores del índice *Kappa* se pueden observar en la tabla 15.

Ahora bien, el índice *Kappa* puede presentar algunos inconvenientes. En primer lugar, el intervalo de valores para su interpretación está establecido de forma arbitraria, si bien está perfectamente aceptado por la comunidad científica. En segundo lugar, el valor del índice *Kappa* depende de la prevalencia de la variable o del carácter estudiado. En general, sucede que cuando se comparan los resultados obtenidos por dos observadores para un determinado carácter y ambos obtienen prevalencias muy altas (o muy bajas), el índice *Kappa* está penalizado para una misma proporción de resultados iguales. De la misma forma, para la misma proporción de resultados iguales, cuanto menor sea la diferencia entre las prevalencias observadas por cada observador más penalizado estará el valor del índice *Kappa*. Además, el índice estará más penalizado todavía si las prevalencias altas o bajas observadas tienen valores simétricos para los dos observadores, con respecto a una prevalencia del 50% (Hospital Ramón y Cajal, 2009).

Por tanto, para una estimación adecuada del valor del índice *Kappa* es necesario conocer la prevalencia del carácter estudiado en la población y las prevalencias observadas por cada observador (Hospital Ramón y Cajal, 2009).

**Tabla 15. Interpretación del grado de acuerdo en función del valor del índice *Kappa* según Landis y Koch (Hospital Ramón y Cajal, 2009)**

<i>Intervalos del índice Kappa</i>	<i>Grado de acuerdo</i>
< 0,00	Sin acuerdo
0,00 – 0,20	Insignificante
0,21 – 0,40	Mediano
0,41 – 0,60	Moderado
0,61 – 0,80	Sustancial
0,81 – 1,00	Casi perfecto

#### 8.2.4.9. Prevalencia real

La prevalencia no es un parámetro de rendimiento de los test. Desde un punto de vista epidemiológico, es la proporción de individuos que en un determinado momento se consideran positivos a una enfermedad en una población. En este estudio, la prevalencia real es la proporción de individuos clasificados como positivos por el test estándar en relación al total de individuos incluidos en la muestra y, por tanto, su valor es independiente del test que se está evaluando. La importancia de este dato radica en el hecho de que algunos de los parámetros de rendimiento estudiados se verán afectados por la prevalencia de la enfermedad en la población (ej: valores predictivos o índice *Kappa*) y la muestra seleccionada puede no ser representativa de la población sobre la que se va aplicar el test.

### 8.3. El aseguramiento de la calidad en los laboratorios de ensayo.

La suficiencia técnica de los laboratorios de ensayo se garantiza mediante el cumplimiento de las normas de aseguramiento de la calidad. La obligatoriedad del cumplimiento de estas normas se inició básicamente en la década de los 90. Los primeros laboratorios afectados fueron todos aquellos responsables de la realización de ensayos sobre productos destinados a consumo humano a los que se les exigía el cumplimiento de estas normas. A modo de ejemplo podemos citar el Decreto 14/2000, de 7 de enero, de la CA de Galicia sobre autorización de laboratorios para la realización de determinados ensayos de control de productos alimenticios relacionados con el consumo humano (DOG nº 19 de 28 de enero de 2000) que en su introducción indica lo siguiente: *“Por otro lado, la Directiva 93/99/CE establece que los estados miembros adoptarán todas las medidas necesarias para garantizar que los laboratorios a los que se refiere el artículo 7 de la Directiva 89/397/CE cumplan los criterios generales de funcionamiento establecidos en la norma EN 45001 (UNE 66 501), completados con los métodos de trabajo normalizados y a verificación por sondeo de su cumplimiento por parte del personal de garantía de la calidad....”* y más adelante continua: *“Así mismo, establece que los estados miembros designarán a los órganos encargados de la evaluación de los laboratorios, los cuales deberán cumplir los criterios generales de los órganos de autorización de laboratorios establecidos en la norma europea EN 45003 (UNE 66503)”*.

El Reglamento (CE) nº 2160/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 17 de noviembre de 2003, sobre el control de *Salmonella* spp. y otros agentes responsables de zoonosis transmitidas por los alimentos (DOUE núm. 325, de 12 de diciembre de 2003) en el artículo 12 sobre autorización de laboratorios, requisitos de calidad y métodos de ensayo aprobados establece lo siguiente:

*“Los laboratorios participantes en programas de control según lo dispuesto en los artículos 5 y 7 deberán, a efectos de los análisis de muestras para detectar la presencia de las zoonosis y de los agentes responsables indicados en la columna 1 del anexo I:*

- a) ser laboratorios designados por la autoridad competente; y*
- b) aplicar sistemas de aseguramiento de calidad acordes con la actual norma EN/ISO 17025 a más tardar dentro de los 24 meses a partir de la entrada en vigor del presente Reglamento o dentro de los 24 meses a partir de la fecha de inclusión de nuevas zoonosis o agentes responsables de zoonosis en la columna 1 del anexo I.”*

Por último citar el Reglamento (CE) nº 882/2004 sobre los controles oficiales efectuados para garantizar la verificación del cumplimiento de la legislación en materia de piensos y alimentos y la normativa sobre salud animal y bienestar de los animales que en su artículo 12 establece lo siguiente sobre laboratorios oficiales:

- “1. La autoridad competente designará los laboratorios que pueden realizar el análisis de las muestras tomadas en los controles oficiales.*
- 2. Sin embargo, las autoridades competentes podrán designar únicamente laboratorios que funcionen y estén evaluados y acreditados conforme a las siguientes normas europeas:*
  - a) EN ISO/IEC 17025, «Requisitos generales relativos a la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración»;*.....
- 4. Las autoridades competentes podrán anular la designación a que refiere el apartado 1 cuando dejen de cumplirse las condiciones previstas en el apartado 2.”*

Básicamente, la calidad de un producto o de un servicio viene a estimar el grado de expectativas y necesidades que quedan cubiertas cuando un determinado cliente accede a ese producto o servicio. Por tanto, la calidad constituye un elemento básico de competencia en los mercados, de forma que aquellos productos o servicios que consigan una mejor relación entre el coste y el nivel de expectativas y/o necesidades cubiertas dispondrán de una ventaja evidente frente a sus competidores.

Cuando trasladamos el concepto de la calidad a los laboratorios de ensayo, básicamente estamos hablando de las garantías que el laboratorio es capaz de dar a sus clientes o usuarios en relación a los resultados de sus ensayos, es decir, los resultados serán lo que tienen que ser dentro de unos límites previamente establecidos. Además, estos resultados serán reproducibles en cualquier otro laboratorio que disponga de sistemas de calidad aplicados a sus actividades si realizase análisis sobre las mismas muestras.

Obtener niveles de calidad adecuados en los laboratorios es difícil, tiene un coste importante y precisa de un nivel de formación y motivación del personal muy elevadas. La implantación de los sistemas de la calidad lleva implícito el uso de nuevos términos que constituyen, en su conjunto, todo un modelo de gestión para los laboratorios (tabla 16). En primer lugar, los laboratorios deben establecer una *Política de la Calidad*, que viene a constituir el

compromiso expreso de los máximos responsables de la organización con la calidad y tiene por objeto definir las directrices y los objetivos generales del laboratorio con respecto a la misma, comprometiéndose con su cumplimiento e involucrando a todo el personal.

La *Gestión de la Calidad* constituye el conjunto de medidas adoptadas para trasladar la *Política de Calidad* a las actividades del laboratorio. Los medios utilizados para la *Gestión de la Calidad* implican a la estructura organizativa, al cuadro de responsabilidades, al conjunto de procedimientos y a la cuantía de los recursos técnicos y humanos necesarios para la toma de decisiones.

El *Aseguramiento de la Calidad* constituye el conjunto de acciones planificadas y sistemáticas necesarias para garantizar que los resultados obtenidos se ajustan a los requisitos establecidos.

El *Control de la Calidad* es el conjunto de medidas que permiten medir la calidad de los ensayos y compararla con la norma o con la de otros laboratorios, al mismo tiempo, que se utilizan para eliminar las causas responsables de las desviaciones observadas en la realización de los ensayos.

La norma fundamental de la calidad es la UNE-EN ISO/IEC 17025:2005 sobre requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración. En la introducción se pueden leer sus principales objetivos en relación a los laboratorios que la cumplan: “*Contiene (la norma) todos los requisitos que deben cumplir los laboratorios de ensayo y calibración si desean demostrar que poseen un sistema de gestión eficaz, son técnicamente competentes y son capaces de generar resultados técnicamente válidos*”. Por otro lado, será de aplicación para métodos normalizados, para métodos no normalizados y para métodos desarrollados por los propios laboratorios.

Desde el punto de vista operativo, la Norma se organiza en dos grandes áreas de actuación: los requisitos de gestión y los requisitos técnicos. En la tabla 17 se incluye una relación de los requisitos incluidos en cada una de ellas. En la figura 17 se esquematiza la aplicación de la norma en un laboratorio de ensayo.

**Tabla 16. Definiciones de términos básicos de la Calidad. ISO 8402 y otras.**

<b>Término</b>	<b>Función y objetivos</b>
Política de la Calidad	Establece las directrices y los objetivos generales del laboratorio en materia de calidad
Gestión de la Calidad	Fija los criterios concretos de la calidad, organización de recursos, formación, auditorías, etc., Implica a la estructura, a los procedimientos, al cuadro de responsabilidades, etc.
Aseguramiento de la Calidad	Acciones que garantizan el cumplimiento de los requisitos establecidos
Control de la Calidad	Cuantifica, compara y corrige la calidad de los ensayos
Proceso	Conjunto de recursos y actividades relacionadas entre si que transforman elementos entrantes en elementos salientes
Procedimiento	Manera especificada de realizar una actividad

Tabla 17. Contenido básico de la UNE-EN ISO/IEC 17025

REQUISITOS DE GESTION	REQUISITOS TECNICOS
Organización general del laboratorio incluyendo una entidad con responsabilidad legal	Personal
Sistema de gestión de todas las actividades realizadas, con una política de la calidad claramente definida por la alta dirección	Instalaciones y condiciones ambientales
Control de todos los documentos generados en el laboratorio	Métodos de ensayo y de calibración y validación de los métodos
Revisión de los pedidos, ofertas y contratos	Equipos
Subcontratación de ensayos y calibraciones	Trazabilidad de las mediciones
Compras de servicios y de suministros	Muestreo
Servicio al cliente	Manipulación de los ítems de ensayo y o de calibración
Quejas	Aseguramiento de la calidad de los resultados de ensayo y calibración
Control de trabajos o calibraciones no conformes	Informes de los resultados
Mejora	
Acciones correctivas	
Acciones preventivas	
Control de los registros	
Auditorías internas	
Revisiones por la dirección	

Figura 17. Esquema general de aplicación de la UNE-EN ISO/IEC 17025 en un laboratorio  
(Elaboración propia)



## **8.4. Verificación interna de métodos de ensayo de ELISA**

### **8.4.1 Generalidades sobre la verificación interna de los test de ELISA**

En relación a la situación de los métodos de ensayo con respecto a su validación se pueden establecer tres (Gabinete de Servicios para la Calidad, 2009):

- Métodos normalizados: generalmente están descritos en algún documento oficial, norma o publicación de un organismo internacional y han sido elaborados o validados por grupos de expertos. Para estos métodos se conocen sus parámetros de rendimiento que están evaluados en condiciones de aplicación muy dispares.
- Métodos normalizados con modificaciones: se corresponden con alguno de los métodos del apartado anterior en los que se han realizado cambios, como por ejemplo: nuevos reactivos, variaciones en los tiempos de incubación, aplicación sobre nuevas matrices, etc, que obligan a realizar nuevos estudios de validación para conocer su comportamiento.
- Métodos internos o no normalizados: son métodos elaborados por algún laboratorio o investigador de los que no se dispone de suficiente información por lo que es necesario realizar estudios de validación que permitan conocer sus parámetros de rendimiento. Los estudios se realizarán en laboratorios diferentes laboratorios, en condiciones diversas, sobre diferentes matrices, etc.

En el ámbito de la sanidad animal, los métodos normalizados están validados siguiendo los procedimientos de la OIE (OIE, 2006a). Para que los otros grupos de métodos puedan ofrecer el mismo nivel deben ser validados siguiendo las mismas pautas. Los métodos validados podrán ser utilizados por los laboratorios con las máximas garantías.

En la primera fase de la validación de un método de ensayo se incluyen diferentes estudios para la estimación del rango de detección, de la exactitud (veracidad y precisión) y de la Se y Sp analítica del método (OIE, 2006a). En esencia, esta fase constituye la primera validación del método en las condiciones del laboratorio de ensayo. Cuando posteriormente los laboratorios de uso seleccionan esos métodos para diagnóstico, lo primero que deben hacer es una validación interna para demostrar que el comportamiento en sus instalaciones se ajusta a lo esperado. A esta validación interna del método se le denomina verificación interna. Dicho de otra forma, la verificación interna de un método de ensayo tiene como objetivo comprobar dentro del laboratorio de uso que un método previamente validado en otro ámbito conduce a resultados fiables (Rius y cols, 2008).

Existen dos grandes grupos de métodos de ensayo, cuantitativos y no cuantitativos, para los que se definen diferentes parámetros de validación y procedimientos para la



obtención de esos parámetros. Los primeros se caracterizan porque el resultado del ensayo da un valor numérico continuo dentro de un rango de datos. La expresión del resultado incluye dos valores, el de la medida y el de la incertidumbre. Los no cuantitativos pueden ser a su vez de dos tipos: los cualitativos en los que el resultado obtenido tiene dos posibles valores (positivo/negativo, presencia/ausencia, etc.) y los semicuantitativos, en los que el resultado no es un valor único sino una cuantificación somera que permite agruparlos en clases (ejemplo: positivo, positivo débil, dudoso, negativo). En este último grupo se incluyen los test de ELISA.

**Tabla 18. Principales parámetros de calidad para métodos cualitativos y cuantitativos (Ruisánchez y cols., 2003)**

CUANTITATIVO	CUALITATIVO
Se, Sp	Se, Sp
Selectividad: interferencias	Selectividad: interferencias
Límite de detección	Límite de detección
Rango y linealidad	Probabilidad de falsos positivos y de falsos negativos
Incertidumbre	Límite de corte (cut-off)
Exactitud: veracidad, precisión	Incertidumbre o región de error
Robustez	Robustez
.....	.....

Los parámetros propuestos para la validación de métodos de ensayo, en función del tipo de método, aparecen reflejados en la tabla 18. Algunos de ellos son específicos de los test cuantitativos como es la incertidumbre. Otros son característicos de los test cualitativos como es el caso de la proporción de falsos positivos y negativos o el límite de corte (Ruisánchez y cols., 2003). La validación de métodos cuantitativos es mucho más compleja que la de cualitativos debido, básicamente, a la necesidad de estimar su comportamiento en todo el rango de detección junto con las incertidumbres asociadas a esas medidas.

Previamente a la validación es necesario recopilar toda la información disponible sobre el método, con especial atención a la normalización. En relación a los objetivos perseguidos es necesario determinar si el método será utilizado para criba o para confirmación y cuáles son los requisitos a cumplir, especialmente si existe alguno de carácter legal (por ejemplo: detección de un determinado estándar internacional a una determinada concentración, etc). A continuación, la sistemática de validación debe definir los parámetros a estimar en función del tipo de método (cualitativo o cuantitativo), los límites admisibles de esos parámetros, el tipo de experimentos adecuados para su estimación y el número recomendable de los mismos (Gabinete de Servicios para la Calidad, 2009).

La norma UNE-EN ISO/IEC 17025 describe el proceso a seguir en la validación de un método de ensayo cualquiera. Este proceso es aplicable a la verificación interna que en esencia constituye la validación del método en los laboratorios de rutina. A modo de resumen, el proceso de validación incluye los siguientes apartados:

- Selección del método y especificación de la finalidad prevista de uso.
- Elaboración escrita del método de ensayo.
- Fijar los requisitos que debe de cumplir el método y sus valores aceptables, es decir, los parámetros de validación o de verificación interna.
- Procedimiento de estimación de los parámetros de validación o de verificación interna y tratamiento estadístico de los valores obtenidos.
- Declaración de la validez del método para los fines previstos.

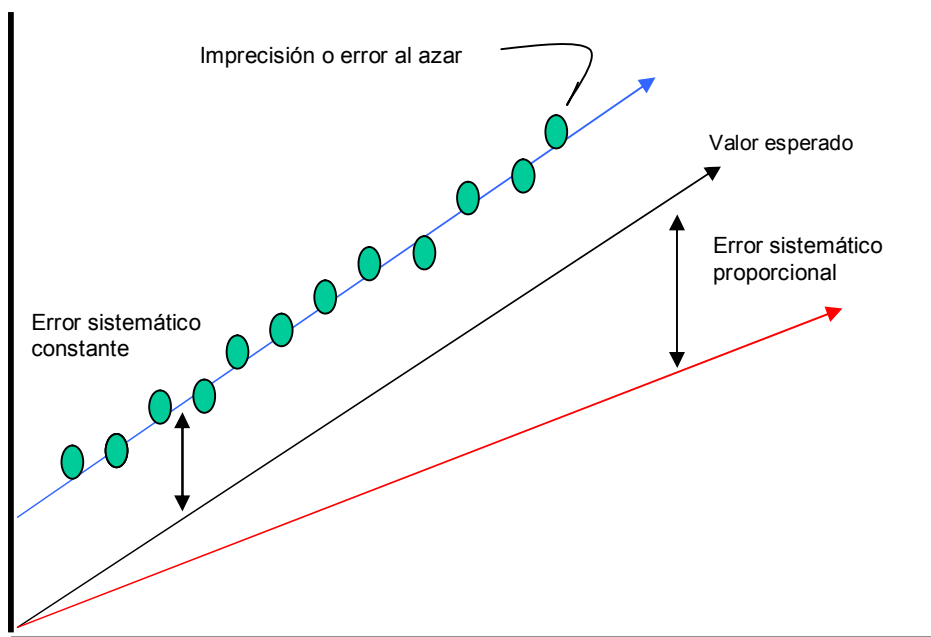
#### **8.4.2 Principales parámetros utilizados en la verificación de métodos de ensayo**

Los más importantes aparecen reflejados en la tabla 18. A continuación se indica una breve definición de aquellos más relevantes.

- Exactitud: es la concordancia entre el valor de un estándar de referencia y el valor obtenido cuando se investiga ese mismo estándar con el método. Este concepto tiene dos componentes: la veracidad, que guarda relación con la existencia de errores sistemáticos (inexactitud o sesgo) y la precisión, en relación a la existencia de errores aleatorios (imprecisión), (figura 18).
- Precisión: grado de concordancia entre resultados de mediciones obtenidas independientemente bajo condiciones establecidas de una misma muestra. Los estudios de precisión se pueden realizar en dos situaciones diferentes; las condiciones de repetibilidad, en las que los equipos, métodos y operarios son los mismos y se realizan en períodos de tiempo cortos, y la condiciones de reproducibilidad, en las que se investigan las mismas muestras por el mismo método, pero variando todo lo demás: diferentes laboratorios, equipos, personas, etc y en períodos de tiempo largos. Cuando los ensayos se realizan en el mismo laboratorio, pero variando lo máximo posible las condiciones de realización de los ensayos (operarios, equipos, fechas...) se habla de repetibilidad intermedia.
- Rango o intervalo de trabajo: corresponde a los valores del parámetro en los que se obtiene una precisión y una veracidad adecuada a la finalidad propuesta.
- Linealidad o función de respuesta: es la relación entre la concentración del componente a analizar y la respuesta del método. Esta relación se denomina comúnmente curva patrón y en el caso de los test de ELISA es una curva de tipo sigmoideo.
- Selectividad/Sp: hace referencia a la capacidad del test para diferenciar entre componentes próximos al analizado. Por tanto, ningún otro componente presente en la muestra contribuye al resultado del ensayo. En los test de ELISA es de especial importancia el que puedan diferenciar entre Ac procedentes de agentes próximos al investigado.

- Límite de detección: es de especial importancia en cualquier test y se corresponde con la mínima concentración del componente que se puede detectar por un método con un nivel aceptable de confianza de que dicha concentración es superior al blanco del ensayo.
- Límite de corte: corresponde al valor de la medida que permite clasificar a los individuos en una clase o en otra para test cuantitativos y semicuantitativos.
- Robustez: es la capacidad del test para ofrecer resultados similares en condiciones diferentes. En consecuencia, un test es más robusto cuanto menos dependan los resultados de las condiciones de realización del ensayo.
- Falsos positivos: proporción de resultados positivos obtenidos sobre un conjunto de muestras de valor inequívocamente negativo obtenido por otros test de referencia.
- Falsos negativos: proporción de resultados negativos obtenidos sobre un conjunto de muestras de valor inequívocamente negativo obtenido por otros test de referencia

Figura 18. Representación gráfica de la exactitud de un método de ensayo



*Esta figura representa los dos componentes de la exactitud (precisión y veracidad). La precisión guarda relación con la existencia de errores aleatorios. La veracidad guarda relación con la existencia de errores sistemáticos que pueden presentarse de forma constante o de forma proporcional.*

### 8.4.3 Estándares y muestras para la verificación interna de los test de ELISA

Para la verificación interna de métodos de ensayo es necesario disponer de muestras de valor conocido, cuestión que en muchas ocasiones constituye un problema muy

importante, sobre todo en el caso de enfermedades no presentes en las poblaciones, pero que son de declaración obligatoria, como es el caso de la peste porcina clásica o de la africana, por citar algún ejemplo. El acceso a muestras negativas suele ser menos problemático, aunque en poblaciones vacunadas frente a determinadas enfermedades es posible que no exista ningún animal libre de Ac frente a la enfermedad.

En general, los laboratorios disponen de cuatro fuentes básicas para la obtención de muestras de valor conocido (Gabinete de Servicios para la Calidad, 2009):

- a) Materiales de referencia o estándares secundarios o terciarios trazables a los estándares internacionales y suministrados por los laboratorios nacionales de referencia.
- b) Muestras sobrantes procedentes de ensayos de intercomparación.
- c) Muestras analizadas y caracterizadas por métodos diferentes al estudiado.
- d) Si no existe otro tipo de muestras, se puede proceder a la contaminación de matrices, inoculación de animales con el agente infeccioso o a la inmunización.

#### **8.4.4 Procedimiento de verificación interna de los test de ELISA**

El procedimiento de verificación interna deberá incluir los parámetros a estimar, los valores esperados de esos parámetros y los ensayos necesarios para esa estimación (UNE-EN ISO/IEC 17025:2005). Estos ensayos deberán incluir estudios en condiciones de repetibilidad y en condiciones de repetibilidad intermedia con estándares de referencia o muestra de valor conocido. Si además se dispone de resultados obtenidos en ensayos interlaboratorio se podrá estimar la exactitud y la precisión en condiciones de reproducibilidad (Jacobson, 1998).

Aunque los test de ELISA establecen el resultado del ensayo mediante valores de DO no se consideran test cuantitativos sino test semicuantitativos y el procedimiento y los parámetros de verificación a aplicar serán los correspondientes a estos últimos.

El objetivo de la verificación interna de los test de ELISA es garantizar la detección de niveles bajos de la sustancia a investigar evitando la aparición de muchos falsos positivos. En la práctica, cuando se produce esta situación se recurre a la utilización de test de confirmación, cuya principal característica es su Sp.

La OIE recomienda el uso de dos estándares positivos, fuerte y débil, y uno negativo en las placas de ELISA (OIE, 1998). Los estándares positivos definen el rango de detección de las muestras positivas. El estándar positivo fuerte determina el límite superior de detección del método. Además, se utiliza para establecer el COff en la mayor parte de los casos. El positivo débil se debe obtener por dilución del positivo fuerte y tiene que ser detectado inequívocamente por el test. En cada placa, la diferencia entre ambos controles debe tener un valor determinado (OIE, 2008).

El valor del control positivo débil (C+) se puede obtener con el método propuesto por Wright (1998) mediante diluciones en razón 2 del positivo fuerte con un negativo y la posterior determinación de la porción lineal de la curva. Según otro criterio el que el valor del positivo débil será el correspondiente a un factor de dilución 3 del control positivo fuerte (C++). El C++ deberá situarse en el límite más alto de la linealidad de la curva dosis-respuesta y el positivo débil deberá ser detectado por encima del COff (Rabenau y cols., 2007).

Para garantizar el comportamiento del test es recomendable determinar la veracidad y la precisión de ambos controles positivos, siendo imprescindible hacerlo con el positivo débil. La estimación de la precisión es esencial para la elaboración de los gráficos de control internos que ofrecen una visión excelente del comportamiento del test en el tiempo (Jacobson, 1998; Crowther, 2009).

Adicionalmente, se incluirán muestras negativas para completar los estudios de veracidad. El valor de estos sueros deberá ser confirmado por otras técnicas, pero es recomendable que alguno de ellos proceda de individuos sospechosos de reacciones cruzadas o afectados por agentes próximos al investigado (Rabenau y cols., 2007). Los valores de DO de los controles negativos deberán contrastar inequívocamente con los de los controles positivos.

**Tabla 19. Requerimientos mínimos para verificación y validación de test o sistemas de test en virología clínica (Rabenau y cols., 2007)**

Verificación	Validación
Exactitud Precisión intra e inter ensayo Linealidad (para cuantitativos)	Exactitud Se Sp Precisión intra e inter ensayo Linealidad (para cuantitativos)

La validación de un método es más compleja que la verificación interna e incluye un mayor número de parámetros a investigar, como se indica en el ejemplo de la tabla 19, pero ambos estudios incluyen ensayos de exactitud y de precisión intra e interensayo, variando el número de repeticiones de cada una de las muestras usadas.

En la tabla 20 se describe un modelo de verificación interna aplicable a test de ELISA que incluye la estimación de la exactitud y la precisión intra e interensayo utilizando muestras positivas fuertes y débiles y controles negativos. Para la estimación de la veracidad, como componente de la exactitud, se propone el uso de tres muestras positivas fuertes, tres muestras positivas débiles y tres negativas o, en su defecto, cada una de esas muestras por triplicado. Todas las muestras, o sus réplicas, pueden ser analizadas en un único ensayo. El resultado esperado es que el test sea capaz de clasificar todas las muestras según su valor conocido, las positivas como positivas y las negativas como negativas. La estimación de la veracidad es especialmente importante en los puntos próximos al COff del ensayo por razones obvias, por lo que es recomendable elevar el número de ensayos en este nivel. Para

la estimación de la veracidad también se pueden utilizar los resultados obtenidos con las muestras de valor conocido incluidas en los diferentes ensayos a lo largo del tiempo (Gabinete de Servicios para la Calidad, 2009).

La estimación de la precisión incluye estudios intraensayo e interensayo, dentro de la misma placa, en el mismo día y en diferentes días (tabla 20). Los resultados obtenidos en la misma placa lo son en condiciones de repetibilidad. Los obtenidos en el mismo día y, sobre todo, en diferentes días deberían ser en condiciones de repetibilidad intermedia con cambio de equipos, de personal y de período de ensayo. En los estudios intraensayo es suficiente con obtener tres valores diferentes para las muestras positivas en un único ensayo. En los estudios interensayo se investigan las dos muestras positivas una vez en cada placa, pero en tres días diferentes. La estimación de la precisión se puede realizar mediante el cálculo de la *SD* o del *CV*. En términos de *SD*, la precisión tiene que estar dentro del rango de dos *SD* de la *M* de los valores esperados para los estándares. Si la precisión se expresa en términos de coeficientes de variación, el valor óptimo es por debajo del 10%. Las muestras recomendables para la estimación son el estándar positivo fuerte y el estándar positivo débil (Rabenau y cols., 2007).

**Tabla 20. Verificación de un test de Ac, número de muestras requeridas y resultado por parámetro modificada de Rabenau y cols., 2007**

	Tipo de muestra	Nº de muestras requeridas	Nº de ensayos	Nº de resultados obtenidos	Resultado esperado
<b>Exactitud</b>	Positivo fuerte	3	1	3	Positivo en todos los casos
	Positivo débil	3		3	Positivo en todos los casos
	Negativo	3		3	Negativo en todos los casos
<b>Precisión intraensayo</b>	Positivo fuerte	1	1	3	CV menor del 10% para cada grupo de muestras (Positivo fuerte y Positivo débil)
	Positivo débil	1		3	
<b>Precisión interensayo</b>	Positivo fuerte	1	3	3	
	Positivo débil	1		3	

La verificación interna de un test de ELISA también puede incluir una estimación de la *Se* y de la *Sp* del test en el laboratorio a partir del resultado obtenido con muestras de valor conocido, en condiciones de repetibilidad y de repetibilidad intermedia, y mediante el cálculo del porcentaje de falsos positivos y de falsos negativos generados por los ensayos (Gabinete de Servicio para la Calidad, 2009). Esta sistemática es especialmente útil para la verificación de test cualitativos que no generen resultados numéricos, como es el caso de la AMRB. La estimación de falsos negativos se obtiene a partir del análisis de muestras positivas. El número de resultados necesarios obtenidos con estas muestras (o de repeticiones de estándares sino se dispone de otro tipo de muestras) depende de la probabilidad requerida para el ensayo. Como mínimo del 90% y siendo recomendable del 95%. De una forma

aproximada, en el primer caso el número de repeticiones necesario es de 10 y en el segundo caso de 20, debiendo obtenerse 9 de 10 resultados satisfactorios para un 90% de probabilidad y 19 de 20 para un 95% de probabilidad (Gabinete de Servicios para la Calidad, 2009).

La estimación de los falsos positivos se realiza con muestras negativas. Lo más adecuado es el uso de muestras negativas procedentes de animales con enfermedades similares en cuanto a su etiología, animales con síntomas similares, pero por procesos diferentes, animales con reacciones cruzadas debidas a otros agentes, etc. En la práctica es muy difícil disponer de este tipo de muestras por lo que la investigación de unas 10 muestras negativas confirmadas por otros test puede ser suficiente. El número de resultados necesarios y la probabilidad requerida será similar a lo comentado para las muestras falsas negativas, aunque puede ser suficiente unos niveles menos exigentes tal como se indica en la tabla 21 (Gabinete de Servicios para la Calidad, 2009).

Los resultados obtenidos con los dos tipos de muestras se representan en tablas de 2 x 2 similar a la de la tabla 13. Para el cálculo de falsos positivos y de falsos negativos se aplicarán las siguientes fórmulas:

$$\text{Falsos negativos} = \frac{\text{FN}}{\text{FN} + \text{VN}} \qquad \text{Falsos positivos} = \frac{\text{FP}}{\text{FP} + \text{VP}}$$

De todas formas, los requisitos apuntados anteriormente pueden variar según el uso al que se destine el test (tabla 21).

**Tabla 21. Porcentajes recomendables de falsos positivos y de falsos negativos en la verificación interna de un test de ELISA utilizando tablas de 2x2 (Gabinete de Servicios para la Calidad, 2009)**

	Método de cribado	Método de confirmación (valores recomendados con respecto al método de cribado)
<b>Falsos negativos</b>	< 5%	< 5%
<b>Falsos positivos</b>	< 10%	< 5%, preferible el 1%

### 8.4.5 Control interno de calidad para los test de ELISA

El control de interno de calidad, IQC en sus iniciales en inglés, tiene como objetivo demostrar el funcionamiento correcto de los test cuando se ejecutan, garantizando la exactitud de los resultados (veracidad y precisión). Tal y como se indica en la tabla 16, el control de calidad *“cuantifica, compara y corrige la calidad de los ensayos”*. Es decir, mide la calidad del resultado, lo compara con los estándares establecidos y permite interpretar las diferencias entre lo obtenido y lo deseado.

Según la norma UNE-EN ISO/IEC 17025 todos los laboratorios deben disponer de documentos escritos en los que se reflejen el control de calidad aplicado a cada uno de los ensayos realizados. Por lo menos deberá contener: las muestra utilizadas en el control, la frecuencia de uso de esas muestras, el resultado esperado de su análisis y las medidas a adoptar en el supuesto de que los resultados obtenidos no se ajusten a los esperados.

Existen dos herramientas fundamentales para el control de calidad: los ensayos de capacidad o interlaboratorio y el uso de muestras de valor conocido en los ensayos de rutina.

Se recomienda que los ensayos interlaboratorio se realicen dos veces al año (OIE, 1998). Constituyen la principal herramienta para evaluar la reproducibilidad de los ensayos, ya que comparan los resultados obtenidos en diferentes laboratorios, sobre alícuotas de las mismas muestras y en las condiciones características de cada uno de ellos, aunque las fechas de análisis están fijadas previamente.

Para el control de calidad rutinario se utilizan muestras de valor conocido. Los principales tipos de estas muestras son los siguientes: materiales de referencia, material de referencia certificado, estándares primarios, secundarios o terciarios, restos de muestras de ensayos interlaboratorio y muestras internas caracterizadas por otros ensayos. Estas muestras se utilizan básicamente para el estudio de la exactitud de los métodos (Gabinete de Servicios para la Calidad).

#### 8.4.5.1 Muestras para control interno de calidad en los test de ELISA

Las muestras utilizadas para el control interno deben estar perfectamente caracterizadas y disponibles en cantidad suficiente para utilizarse de forma rutinaria. Para los test de ELISA se definen tres tipos de muestras control para utilizar en todos los ensayos: un control C++, un C+ y un CN que deben ser suministrados con el test. El fabricante también debe suministrar los valores esperados de esos controles cuando se ejecute el ensayo. Estos controles se utilizan por duplicado, aunque existen protocolos para utilizar hasta cuatro muestras de cada uno de ellos por placa de ensayo (Crowder, 2009). Adicionalmente se podrá incorporar otros tipos de muestras como controles, pero siempre serán de valor conocido.



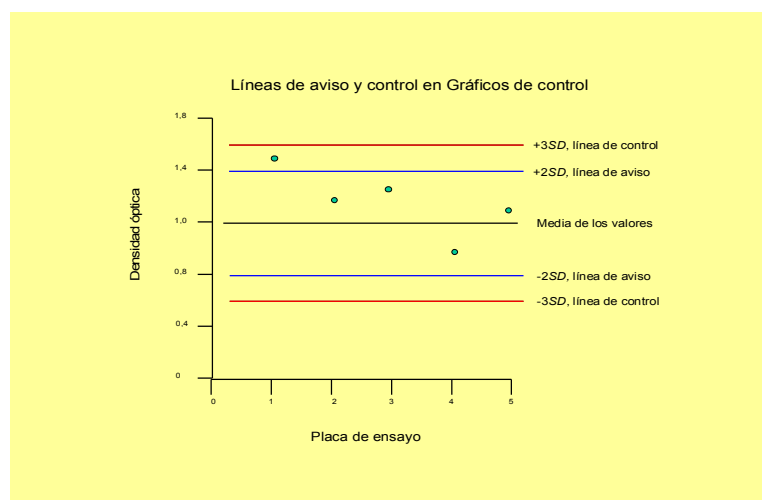
Los controles suministrados con el test se utilizan para establecer el COff de cada placa. A su vez, el COff se utiliza para clasificar a los animales en positivos y negativos. Estos controles también determinan el rango de detección del método. Por tanto, constituyen la primera referencia para utilizar en los gráficos de control. Este valor esperado o bien es suministrado por el fabricante o, en su defecto, es estimado previamente por el laboratorio de ensayo. En este último caso, alrededor de 30 repeticiones pueden ser suficientes para garantizar que los valores aportados son correctos para usarse como referencia en el laboratorio (Rius, 2007).

#### 8.4.5.2 Gráficos de control para test de ELISA

El uso de controles internos no tiene utilidad sino no se realiza un examen continuo de los resultados obtenidos que permitan asegurar que el test proporciona resultados trazables a referencias externas. Una de las herramientas más utilizadas son los gráficos de control. Estas herramientas se basan en el hecho de que una muestra cuando es analizada de forma reiterada con el mismo test y en las mismas condiciones los resultados sólo se verán afectados por errores aleatorios cuya representación gráfica será la de una distribución normal (Rius, 2007). Es decir, el 67% de los resultados se pueden encontrar entre la  $M \pm$  una  $SD$ , el 95% de los resultados entre la  $M \pm$  dos  $SD$  y el 99% de los resultados entre la  $M \pm$  tres  $SD$ . Cuando los resultados obtenidos en los análisis sistemáticos de estas muestras se representan en un gráfico se puede observar, de una forma visual, el comportamiento de un test en el tiempo.

Los gráficos de control definen tres niveles de actuación según la ubicación de los resultados obtenidos con las muestras control: un nivel de resultados óptimos, un nivel de aviso y un nivel de control (figura 19).

Figura 19. Estructura básica de un gráfico de control



Para profundizar en los gráficos de control se va a utilizar como modelo el descrito por la Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación (FAO) y la International Atomic Energy Agency (IAEA) como control interno de calidad, IQC en sus iniciales en inglés, de un ELISAI para la detección de Ac frente a *B. abortus*.

**Tabla 22. Significado y contenido de los gráficos DDD y SDC del modelo de gráficos de control (Crowther, 2009)**

	PARA VALORES OBTENIDOS DE DO				PARA VALORES OBTENIDOS DE PP			
	Columna 1		Columna 2		Columna 3		Columna 4	
	<b>DDD:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Valores medios de cada placa</li> <li>Utilizan las DO</li> <li>Calcular: <math>(M)</math> y <math>2 \times SD</math></li> <li>Controles utilizados: C++ y C+ agrupados por placa</li> </ul>		<b>SDC:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Valores medios de todas las placas de un día</li> <li>Utilizan las DO</li> <li>Calcular: <math>(M)</math> y <math>2 \times SD</math></li> <li>Controles utilizados: C++ y C+ agrupados por día</li> </ul>		<b>DDD:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Valores medios de cada placa</li> <li>Utiliza los PP</li> <li>Calcular: <math>(M)</math> y <math>2 \times SD</math></li> <li>Controles utilizados: C++, C+, Cc, CN agrupados por placa</li> </ul>		<b>SDC:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Valores medios de todas las placas de un día</li> <li>Utilizan las PP</li> <li>Calcular: <math>(M)</math> y <math>2 \times SD</math></li> <li>Controles utilizados: C+, Cc y CN agrupados por día</li> </ul>	
	<i>M</i> (media)	2 x <i>SD</i> (desviación estándar)	<i>M</i> (media)	2 x <i>SD</i> (desviación estándar)	<i>M</i> (media)	2 x <i>SD</i> (desviación estándar)	<i>M</i> (media)	2 x <i>SD</i> (desviación estándar)
C++	Si	Si	Si	Si	Si	Si		
C+	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si
Cc					Si	Si	Si	Si
CN					Si	Si	Si	Si

Para la elaboración de los gráficos de control se puede utilizar el control positivo fuerte (C+++), el control positivo débil (C+), el control de conjugado (Cc) y el control negativo (CN). A su vez, se pueden representar valores de DO bruta (primera y segunda columna) o valores de DO normalizada, en este caso PP (tercera y cuarta columna). Finalmente, independientemente de los valores utilizados, se deben representar en los dos tipos de gráficas propuestas: las tablas DDD que incluye los valores de los controles agrupados por placas (primera y tercera columna) y las tablas SDC que incluyen los valores de los controles agrupados por días (segunda y cuarta columna). Para cada control utilizado se calcula la *M* de los valores, la *SD* y dos veces la *SD* ( $2 \times SD$ ).

En el modelo diseñado por la FAO/IAEA se establecen dos tipos de gráficos: la tabla detallada de datos diarios, DDD en sus siglas en inglés, y la tabla de resumen de datos, SDC en sus iniciales en inglés. En cada uno de ellos se representan los valores obtenidos para los distintos controles utilizados en el ensayo (C++, C+, CN y Cc), tanto de las DO como los PP, tal y como se indica en la tabla 22.

La distribución de los controles y el número de réplicas de cada uno de ellos en cada placa de ensayo se esquematiza en la figura 20.

Se utilizarán gráficos diferentes para la DO y para el PP y también diferentes para los valores de cada placa y para los valores de las placas de cada día. Para que ambos valores se puedan representar es necesario calcular la *M* de los valores de la placa o del día de ensayo, tanto para DO como para PP según la fórmula siguiente:

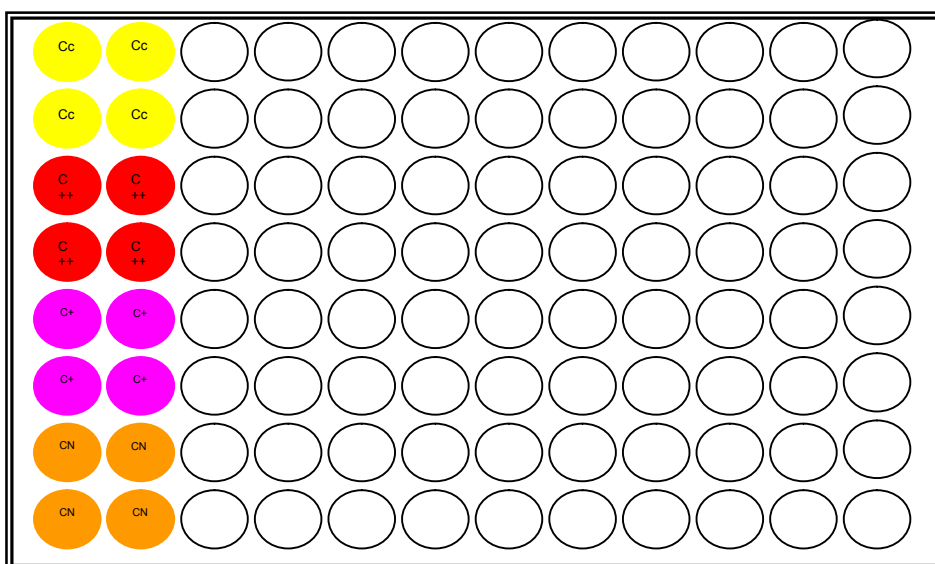
$$M \text{ de las DO (o de los PP) de un control} = \frac{\text{Suma de las DO (o del los PP) de las réplicas del control}}{\text{Nº de réplicas}}$$

El cálculo del PP se realiza por la siguiente fórmula

$$\text{PP de un control o de una muestra} = \frac{\text{Valor de DO de cada réplica del control}}{\text{Valor medio de DO del C++ (*)}} \times 100$$

(\*) Para la M de C++ se desechan el valor más alto y el más bajo

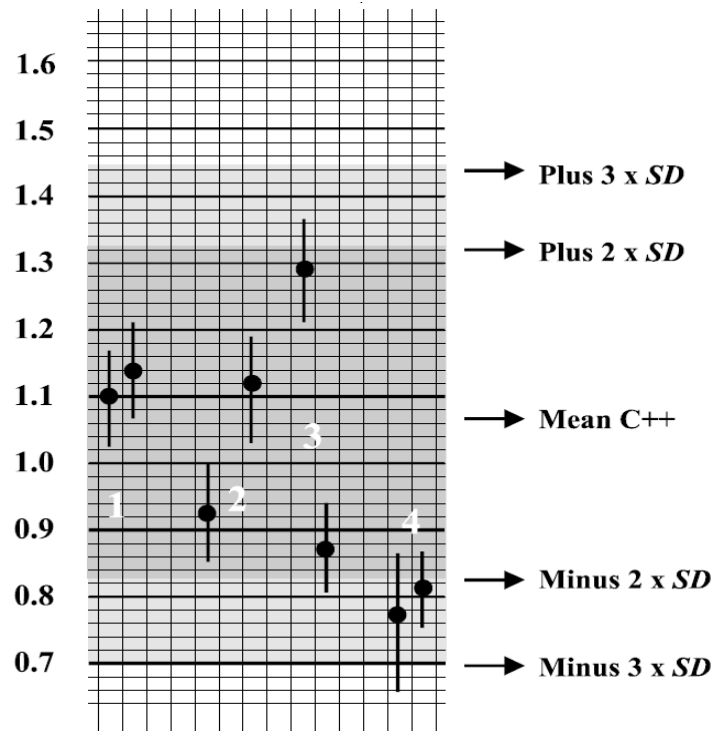
**Figura 20. Distribución de controles en placas de ELISA (Crowther, 2009)**



Los gráficos para cada control deberán incluir como referencia el valor esperado para ese control. Si este valor no está establecido por el fabricante, entonces se deberá obtener mediante los estudios de precisión y de exactitud diseñados para la validación interna del método de ensayo. A este valor esperado se le asocian  $\pm$  dos SD para establecer las líneas de aviso y  $\pm$  tres SD para establecer las líneas de control (figura 19).

En los gráficos DDD se representan los valores medios de DO y de PP, respectivamente, obtenidos según las fórmulas anteriores, para cada placa y para el control C++ y el C+. Estos gráficos permiten comparar los resultados de cada placa individual (figura 21).

Figura 21. Imagen de un gráfico DDD con valores de 8 placas de ELISA diferentes para el C++ (Crowther, 2009)



El gráfico de la figura 21 muestra un ejemplo de la representación de los valores obtenidos para un C++ de 8 placas realizadas el mismo día. Los valores esperados para el C++ están, representados por la Media (Mean) y las líneas de aviso (Plus 2 xSD y Minus 2 xSD) y las de control (Plus 3 xSD y Minus 3 xSD). Los puntos negros representan los valores medios del C++ obtenidos en cada placa con las barras de error correspondientes. A continuación se interpreta el significado del valor de cada placa. Posición 1.- Estos valores corresponden a un test que se comporta perfectamente, tanto las medias como las barras de error se encuentran dentro de los límites de  $\pm 2xSD$ . Posición 2.- Los valores siguen siendo válidos aunque están más desviados de la media que los del caso primero. Posición 3.- En este caso, las barras de error sobrepasan la línea de aviso, por lo que el test presenta algún tipo de problema y debe ser revisado. Posición 4.- Las medias de los valores están fuera de la zona de aviso, los valores son inaceptables, se debe revisar el test antes de continuar con los análisis de nuevas muestras.

En los gráficos SDC se representan los valores medios de DO y de PP de todos los controles, pero como promedio de todas las placas de un día. Mientras en las gráficas DDD se obtiene un valor por control y placa, en las gráficas SDC se obtiene un valor por control y día, por lo que estos últimos gráficos sirven para evaluar tendencias en el comportamiento del test.

Adicionalmente para cada valor, obtenido como promedio de varias medidas, se puede estimar la SD de la M de los valores. Esta SD se representa en los gráficos

mediante barras de error que acompañan al valor de la  $M$  y que también se utilizan para evaluar el comportamiento del test.

En general, cualquier valor por fuera de la línea de aviso de  $\pm$  dos  $SD$  se considera inadecuado, incluidos los valores de las barras de error. En estas situaciones es necesario evaluar las causas y determinar si se continua ejecutando o no el test. Los valores de la  $M \pm$  tres  $SD$  se consideran inaceptables y los resultados obtenidos no son válidos.

### **8.5. Mejora y extensión de los procesos de validación**

Como se lleva expuesto hasta ahora, la validación de un método de ensayo incluye una validación completa por parte del fabricante con la estimación de los parámetros de rendimiento del test, con la información de los valores esperados de los controles del test y con la trazabilidad del resultado a estándares de referencia y una verificación interna en el laboratorio de ensayo que garantice que el método se comporta según lo esperado.

Ahora bien, la validación de un test no finaliza nunca, sino que es un proceso continuo de adaptación en base al desarrollo tecnológico, a la situación cambiante de las enfermedades y a la utilización del test en situaciones y áreas muy diferentes (Jacobson, 1998; OIE, 2006a).

En relación al desarrollo tecnológico, la incorporación de nuevos reactivos o el desarrollo de nuevos test de comparación implica, en muchas ocasiones, que sea necesario volver a realizar estudios de validación para comprobar el efecto de estas variables sobre el comportamiento del test.

Como se indicaba en apartados anteriores, el comportamiento de los test está afectado por la prevalencia de la enfermedad en la población, por lo que es un factor muy importante para la interpretación de los resultados. Lo mismo puede ocurrir si se aplica sobre poblaciones especialmente afectadas por microorganismos responsables de reacciones cruzadas. En otras ocasiones se puede ver afectado por factores como la raza, que además puede ser mayoritaria en determinadas áreas de uso del test (OIE, 2006a).

La implementación de los sistemas de la calidad en los laboratorios y la realización sistemática de ensayos interlaboratorio para evaluar la reproducibilidad de los ensayos también puede afectar al rendimiento de los test.

Por tanto, existen múltiples razones que pueden cuestionar de una u otra forma el rendimiento de los test diagnóstico. Como consecuencia, los test deben ser permanentemente evaluados para todas aquellas situaciones que puedan afectar a los resultados obtenidos.

## **II. Justificación y objetivos**

Los análisis en el ámbito del control oficial deben garantizar la validez de los resultados obtenidos. La herramienta más importante para este fin lo constituye la implantación en los laboratorios de un sistema de la calidad. La norma relacionada con este objetivo para los laboratorios de ensayo es la UNE-EN ISO/IEC 17025. Su cumplimiento implica la obligación de utilizar exclusivamente métodos validados y de disponer de mecanismos que garanticen el comportamiento adecuado de los test en las condiciones particulares de cada laboratorio.

La validación de los métodos de ensayo implica dos niveles de actuación. El primero de ellos es obligación del fabricante o del responsable del desarrollo del test y tiene como objetivos, por un lado, estimar los parámetros de rendimiento del test para una adecuada interpretación de los resultados obtenidos y, por otro, suministrar información al laboratorio de rutina sobre los valores esperados al analizar muestras estándar que se utilizarán para garantizar la reproducibilidad del test. El segundo nivel de validación corresponde al laboratorio de rutina. En este caso, el laboratorio demostrará que es capaz de reproducir el test según los datos suministrados por el fabricante antes de la puesta en uso y durante la realización de los análisis de rutina. Para ello, garantizará que sus resultados sean trazables a estándares internacionales o a otras muestras de referencia de valor conocido. Sin embargo, los métodos de ensayo no siempre se comportan de la misma forma, sino que depende de factores muy diversos que pueden afectar a las poblaciones en las que se utilizan los test, especialmente la situación epidemiológica de la población en relación a la enfermedad objeto de estudio. Por todo ello, con todos los test validados, se realizarán extensiones de la validación inicial cuyo objetivo será conocer el comportamiento del test en diferentes poblaciones, cada una de ellas con sus características específicas.

Los test serológicos utilizados desde el año 1990 en Galicia para el diagnóstico de la brucelosis bovina fueron la AMRB y la FC. La AMRB fue desarrollada por el LNR-B, pero no está incluida como tal en el MPDOIE. Además, estos test presentan algunas desventajas como son:

- Es necesaria una amplia preparación y experiencia para la interpretación de los resultados obtenidos.
- La interpretación de las reacciones en sueros con niveles bajos de Ac es difícil y en muchos casos, ni tan siquiera perceptible a simple vista.
- La hemólisis puede dificultar la interpretación correcta de algún resultado.
- Aparición de resultados falsos positivos.
- En la FC existen sueros que muestran PA.

La prevalencia actual de la brucelosis bovina en Galicia es reflejo del éxito de los programas de erradicación y el objetivo inmediato es situar a la CA como zona oficialmente indemne de brucelosis bovina según los requisitos establecidos por la UE.

Los programas de erradicación aplicados en ganado vacuno a partir de 1990 se basaron en cuatro medidas fundamentales: prohibición de la vacunación, investigación serológica del 100% de las reses bovinas mayores de 12 meses, inmovilización de las explotaciones con animales sospechosos y sacrificio de los animales reaccionantes con repetición de pruebas diagnósticas al resto del rebaño hasta garantizar la eliminación de la infección en la explotación. La aplicación de estas medidas dio lugar a dos tipos de zonas epidemiológicamente diferenciadas:

- Zona prácticamente libre: formada por la mayor parte de la CA en la que la aparición de brotes de la enfermedad es esporádica.
- Zona afectada: formada por pequeñas áreas de montaña (fundamentalmente en la provincia de Lugo) con animales en régimen de semilibertad donde se mantienen explotaciones con animales positivos desde hace años, están bien delimitadas físicamente y la erradicación es difícil por el sistema de manejo y el control de los animales.

Por tanto, las actuaciones a seguir dependerán del área de actuación, así:

- Zonas afectadas y focos activos de brucelosis: el problema lo plantean los animales positivos y los falsos negativos por lo que se deberá priorizar la rápida eliminación de animales afectados y la detección precoz. Las técnicas de análisis deberán ser lo más sensibles posibles.
- Zonas libres de brucelosis: el problema lo plantea la aparición de falsos positivos que obligan a establecer medidas cautelares sobre la explotación y un seguimiento hasta que se descarta la infección. Las técnicas de análisis deberán priorizar la Sp de los resultados.

Por todo ello, este estudio incluye cinco objetivos incluidos en dos grupos:

➤ **Objetivos relacionados con la verificación interna de test serológicos utilizados para el diagnóstico de la brucelosis bovina en laboratorios de análisis de rutina:**

- Objetivo 1. Evaluar un procedimiento para la verificación interna de la AMRB que se ajuste a los requisitos de la norma UNE-EN ISO/IEC 17025.
- Objetivo 2. Evaluar un procedimiento para la verificación interna de test de ELISAI y de ELISAc para el diagnóstico de la brucelosis bovina que se ajuste a los requisitos de la norma UNE-EN ISO/IEC 17025, así como evaluar la utilidad de los gráficos de control para el seguimiento de los resultados obtenidos con los controles internos de calidad.

- **Objetivos relacionados con la extensión de la validación de test serológicos para el diagnóstico de la brucelosis bovina en relación a la situación epidemiológica de la enfermedad en Galicia:**
- Objetivo 3. Estimar los parámetros de rendimiento de cuatro test utilizados para el diagnóstico de la brucelosis bovina, la AMRB, dos ELISAI y un ELISAc utilizando muestras cualificadas por las pruebas “gold standard” de brucelosis (criterio absoluto de comparación).
  - Objetivo 4. Estimar los parámetros de rendimiento de los dos test de ELISAI y del test de ELISAc en comparación con la AMRB y la FC utilizados en serie, aplicando un criterio de comparación relativo.
  - Objetivo 5. Evaluar y definir la utilidad de la AMRB, de la FC, de los dos ELISAI y del ELISAc sobre grupos de muestras procedentes de animales en diferentes situaciones epidemiológicas.



# **III. Material y métodos**

## **1. Estándares y muestras para verificación y control interno**

En la tabla 23 se incluyen las principales características de los controles utilizados en la verificación y los test en los que fueron utilizados. En la tabla 24 se indica el número de veces y las diluciones de cada suero que se incluyeron en las placas de ensayo.

### ***a. Suero patrón secundario de referencia nacional positivo a brucelosis (PSRN-Pos)***

Este control lo suministra liofilizado el Laboratorio Nacional de Referencia para la brucelosis (LNR-B), de Santa Fe, en Granada para su reconstitución con 500 µl de agua destilada. Una vez reconstituido en el laboratorio pasa a ser el patrón terciario. Frente a este patrón terciario se ajustan los sueros propios existentes en el laboratorio que constituirán los patrones cuaternarios para el uso diario en los ensayos. El patrón suministrado por el LNR-B se ajusta a lo especificado en el punto 2.1.5 del Anexo II del Real Decreto 1047/2003.

El patrón terciario se conserva congelado a -20°C hasta el momento de uso. La dilución de uso y los valores esperados cuando se usa en un ensayo determinado son suministrados por el LNR-B y son los siguientes:

- RB: dilución límite positiva 1/25.
- FC: resultado positivo a una dilución 1/128 (640 UIFC).
- ELISAI: positivo a una dilución 1/100 en suero negativo y negativo a una dilución 1/450 en suero negativo.
- ELISAC: positivo a una dilución 1/32 en suero negativo y negativo a una dilución 1/64 en suero negativo.

### ***b. Suero patrón secundario de referencia nacional negativo a brucelosis (PSRN-Neg)***

Este control lo suministra el LNR-B liofilizado para su reconstitución con 1 ml de agua destilada. Una vez reconstituido en el laboratorio pasa a ser el patrón terciario. Frente a este patrón terciario se ajustan los sueros propios existentes en el laboratorio que constituirán los patrones cuaternarios para el uso diario en los ensayos. El patrón suministrado por el LNR-B se ajusta a lo especificado en el punto 2.1.5 del Anexo II del Real Decreto 1047/2003.

El patrón terciario se conserva congelado a -20 °C hasta el momento de uso. La dilución de uso y los valores esperados cuando se usa en un ensayo determinado son suministrados por el LNR-B y son los siguientes:

- RB: negativo a la dilución de reconstitución
- FC: negativo a la dilución de reconstitución o con un valor menor de 8,3 UIFC

- ELISAI: negativo a la dilución de reconstitución.
- ELISAc: el LNR-B no suministra el resultado con respecto a este test.

**c. Suero patrón cuaternario interno positivo (suero Abadín)**

Este patrón interno se obtuvo a partir de dos animales positivos a AMRB y a FC, en uno de ellos también se obtuvo un aislamiento positivo a *B. abortus* biovar 3, recolectados en una cantidad suficiente para garantizar su uso como patrón interno durante muchos años. Los sueros obtenidos se mezclaron en cantidades iguales y se homogeneizaron. La mezcla se centrifugó a 3.500 rpm durante 3 min para eliminar los restos de glóbulos rojos en suspensión. El sobrenadante se analizó nuevamente a AMRB y a FC con un resultado positivo a ambos test. El título a FC fue de 1.700 UIFC. El suero obtenido con este procedimiento fue considerado como patrón puro y se conservó en alícuotas a -20 °C.

**d. Suero positivo bovino 2**

Este patrón es una mezcla de 27 sueros procedentes de una explotación declarada positiva a brucelosis. Todos ellos resultaron positivos a AMRB y a FC. Se mezclaron en diferentes cantidades y se homogeneizaron. La mezcla se centrifugó a 3.500 rpm durante 3 min para eliminar los restos de glóbulos rojos en suspensión. El suero resultante se conservó en alícuotas a -20°C.

**e. Otras muestras positivas utilizadas en la verificación**

Adicionalmente, para la verificación interna de los ELISAs se utilizaron otros tres sueros positivos denominados Suero A, B y C. Sus especificaciones se incluyen en la tabla 23.

**f. Suero negativo bovino de campo**

Está elaborado a partir de los sueros de animales negativos procedentes de explotaciones libres de brucelosis por lo menos en los 5 años anteriores a su recolección y obtenidos durante la realización de las CSG. Los sueros se mezclaron en diferentes cantidades, se homogeneizaron y la mezcla se centrifugó a 3.500 rpm durante 3 min para eliminar los restos de glóbulos rojos en suspensión. El patrón obtenido se conservó en alícuotas a -20°C. Dispone de una certificación como negativo del LNR-B a RB, FC y ELISAI.

Este suero se utilizó para la obtención de las diluciones del suero Abadín, del suero positivo bovino 2 y del PSRN-Pos en la verificación interna de la AMRB.

**g. Controles internos positivos y negativos suministrados con los test de ELISA**

Son los suministrados por el fabricante con el test. El positivo se utiliza generalmente para obtener el COff de cada placa y determinar la clasificación de los sueros en positivos o negativos. El negativo garantiza que en cada placa ensayada se pueden detectar sueros negativos de forma inequívoca. Ambos controles también se utilizan para validar las placas según los criterios establecidos por el fabricante. En la descripción de los ensayos de ELISA se especifican los criterios de validación utilizados.

### h. Suero negativo comercial de vacuno

Suero bovino comercial libre de Ac de brucelosis.

**Tabla 23 . Relación de sueros utilizados en la verificación de los test de AMRB y de los ELISAs**

Nombre del suero o patrón	Aislamiento	Procedencia	Composición	Test en el que se utiliza	Resultado FC en UIFC
PSRN-Pos	Si	LNR-B	Ver especificaciones en el texto	ELISA/AMRB	Ver especificaciones en el texto
PSRN-Neg	No	LNR-B	Ver especificaciones en el texto	ELISA/AMRB	Ver especificaciones en el texto
Suero Abadín (CS181)	Si	Interno. Ganado de monte	Mezcla de dos sueros de animales positivos. Uno de ellos con aislamiento positivo	ELISA/AMRB	Positivo AMRB. FC: 1.700 (análisis internos)
Suero A	Si	Interno. Animales de raza Rubia gallega	Mezcla de cuatro sueros de animales con aislamiento positivo	ELISA	Positivo a AMRB. FC: 1.700 (análisis internos)
Suero B	Si	Interno. Animales de cruce	Mezcla de tres sueros de animales con aislamiento positivo	ELISA	Positivo a AMRB. FC: 1.700 (análisis internos)
Suero C	Si	Interno. Raza Rubia gallega	Suero de un único animal	ELISA	Positivo a AMRB. FC: 250 (análisis internos)
Suero bovino2	No investigado	Interno. Razas sin especificar	Mezcla de 27 sueros de un foco de brucelosis	AMRB	No disponible, pero positivo a AMRB y FC todos los sueros utilizados
Suero negativo bovino de campo	No investigado	Interno. Razas no especificadas	Suero de animales negativos en la CSG de explotaciones libres de brucelosis por lo menos 5 años. Certificado como negativo por LNR-B a RB, FC y ELISAI	ELISA/AMRB	Negativo a AMRB. FC: negativo
Suero negativo comercial de vacuno	No investigado	Empresa privada	Suero comercial bovino negativo	ELISA	No investigado

**Tabla 24. Número y dilución de uso de los sueros utilizados en condiciones de repetibilidad para la AMRB y los ELISAs**

Nombre del suero o patrón	ELISA		AMRB	
	Nº de veces incluida en las placas de ensayo	Diluciones utilizadas de cada muestra	Nº de veces incluida en las placas de ensayo	Diluciones utilizadas de cada muestra
PSRN-Pos	Las dos diluciones por duplicado	1/32 y 1/256	Una vez en cada placa	<ul style="list-style-type: none"> <li>Serie de diluciones desde 1/25 a 1/400</li> <li>Dilución única: 1/25</li> </ul>
PSRN-Neg	Por duplicado en cada placa	Puro	Una vez en cada placa	Puro
Suero Abadín	Por duplicado en cada placa	Diluciones desde 1/32 a 1/16.384	Una vez en cada placa	Diluciones desde 1/2 a 1/16.384
Suero A	Por duplicado en cada placa	Diluciones desde 1/32 a 1/16.384		
Suero B	Por duplicado en cada placa	Diluciones desde 1/32 a 1/16.384		
Suero C	Por duplicado en cada placa	Diluciones desde 1/32 a 1/16.384		
Suero bovino2			Una vez en cada placa	Diluciones desde 1/2 a 1/16.384
Suero negativo bovino de campo	Por duplicado en cada placa	Puro	<ul style="list-style-type: none"> <li>Por duplicado en cada placa como control negativo</li> <li>Para dilución del suero Abadín, del suero positivo bovino 2 y del PSRN-Pos en la verificación</li> </ul>	Puro
Suero negativo comercial de vacuno	<ul style="list-style-type: none"> <li>Por duplicado en cada placa</li> <li>Para dilución de todos los sueros positivos utilizados en la verificación</li> </ul>	Puro		

## 2. Especificaciones técnicas de los ELISAs utilizados

### 2.1. Fundamento de los test de ELISA

#### 2.1.1. ELISA indirecto

En estos test, los pocillos se tapizan con un Ag de *B. abortus*, siendo el más habitual un LPS-S de *B. abortus*. A continuación se dispensa el suero problema en los pocillos y si contiene Ac específicos frente al Ag, reaccionarán con el tapizado del pocillo formando un complejo Ag-Ac que queda fijado. La formación de este complejo se puede evidenciar mediante la adición posterior de un anti-Ac que es un conjugado específico anti-IgG bovino ligado a una enzima, generalmente la peroxidasa. La enzima al reaccionar con un sustrato adecuado producirá una solución cuya intensidad de color es directamente proporcional a la cantidad de Ac presente en el suero problema. Por eso, en este test los sueros positivos son los que presentan la mayor intensidad de color.

#### 2.1.2. ELISA competición

En este test, los pocillos de la microplaca están tapizados con un Ag, siendo el más habitual un LPS-S de *B. abortus*. Durante el ensayo las muestras a investigar se dispensan en el interior de los pocillos junto con un Mab de ratón que reacciona específicamente frente a un epítipo de la cadena O del LPS. Los Ac específicos del suero competirán con el Ac de ratón por su unión al Ag (LPS-S). Como consecuencia, el complejo formado estará constituido por uno u otro Ac en función de la concentración que tenga cada uno de ellos en la solución del pocillo.

Después de la incubación se añade un anti-Ac obtenido en otra especie (por ejemplo, en cabra) y específico frente al mAB obtenido en ratón. Este anti-Ac está conjugado a una enzima, generalmente la peroxidasa de rábano picante. Si el suero problema no contiene Ac específicos frente al LPS-S el complejo formado será todo con el mAB por lo que al añadir el sustrato correspondiente se producirá un cambio de color en función de la cantidad de peroxidasa presente en la reacción. Por último, se mide la intensidad del color obtenido con el colorímetro correspondiente. En este tipo de ensayos las muestras negativas son las que presentan un color más intenso.

### 2.2. Procedimiento de ensayo de los test de ELISA

Para la realización de este estudio se utilizaron 3 tests de ELISA comerciales: un ELISAc, (*Brucella*-Ab C-ELISA Tests kits) y un ELISAi, (*Bruceella*-Ab I—ELISA), ambos fabricados por SVANOVA y un ELISAi, (Chekit Brucellose Serum) de laboratorios IDEXX. Los protocolos de

trabajo abreviados, así como alguna característica básica de los diferentes reactivos de los test se indican en la tabla 28.

### 2.2.1. Expresión e interpretación de resultados en el ELISAI Svanova

#### Cálculo del porcentaje de positividad (PP) para cada muestra

El cálculo del PI se realizará según la siguiente fórmula:

$$PP = \frac{DO_{\text{muestra/control}}}{DO_{\text{Control positivo}}} \times 100$$

#### Validación de la placa

Una placa se valida si se obtienen los siguientes valores con los controles:

- DO del Control positivo del test > de 1.0
- DO del Control negativo < de 0,2
- PP del suero Abadín = deberá corresponder al de un resultado positivo

La estimación de los cálculos anteriores se realiza con los valores medios de los controles y de las muestras, obtenidos previamente, si se han dispensado por duplicado.

#### Interpretación del resultado

Para la interpretación del resultado se aplicarán los criterios establecidos en la tabla 25.

Tabla 25. Interpretación del PP en el ELISAI Svanova

Valor PP	< 40	>= 40
Interpretación	Negativo	Positivo

## 2.2.2. Expresión e interpretación de resultados en el ELISAI Idexx

### Cálculo del porcentaje de positividad (PP) para cada muestra

El cálculo del PI se realizará según la siguiente fórmula:

$$PP = \frac{DO_{\text{muestra}} - DO_{\text{Control negativo}}}{DO_{\text{Control positivo}} - DO_{\text{Control negativo}}} \times 100$$

### Validación de la placa

Una placa se valida si se obtienen los siguientes valores con los controles:

- DO del Control positivo del test < 2,0
- DO del Control negativo < 0,3
- (DO del Control positivo del test) – (DO del Control negativo) ≥ 0,3
- PP del suero Abadín = deberá corresponder al de un resultado positivo

La estimación de los cálculos anteriores se realiza con los valores medios de los controles y de las muestras, obtenidos previamente, si se han dispensado por duplicado.

### Interpretación del resultado

Para la interpretación del resultado se aplicarán los criterios establecidos en la tabla 26.

Tabla 26. Interpretación del PP en el ELISAI Idexx

Valor PP	< 80	>= 80
Interpretación	Negativo	Positivo

### 2.2.3. Expresión e interpretación de resultados en el ELISAc Svanova

#### Cálculo del porcentaje de inhibición (PI) para cada muestra

El cálculo del PI se realizará según la siguiente fórmula:

$$PI = 100 - \frac{DO_{\text{muestra/control}}}{DO_{\text{Control conjugado}}} \times 100$$

#### Validación de la placa

Una placa se valida si se obtienen los siguientes valores con los controles:

- DO del Control del conjugado = 0,75 - 2.0
- PI del Control positivo fuerte = 85 - 110
- PI del Control positivo débil = aconsejable entre 30 – 60 y siempre superior a 30.
- PI del Control negativo = (-10) – 15
- PI del suero Abadín = deberá corresponder al de un resultado positivo

La estimación de los cálculos anteriores se realiza con los valores medios de los controles y de las muestras, obtenidos previamente, si se han dispensado por duplicado.

#### Interpretación del resultado

Para la interpretación del resultado se aplicarán los criterios establecidos en la tabla 27.

Tabla 27. Interpretación del PI en el ELISAc Svanova

Valor PI	< 30	>= 30
Interpretación	Negativo	Positivo

Tabla 28. Procedimiento abreviado de los test de ELISA

	ELISA <sub>I</sub> SVANOVA	ELISA <sub>I</sub> IDEXX	ELISA <sub>Ac</sub> SVANOVA
<b>Ag</b>	LPS-S	LPS-S	LPS-S
<b>DILUYENTE DEL SUERO</b>	Solución de lavado	Solución de lavado	No especificado
VOLUMEN	100 µl	45 µl	90 µl
<b>SUEROS -CONTROLES</b>			
VOLUMEN	5 µl	4 µl	10 µl
TEMPERATURA	37 °C	Ambiente	37 °C
TIEMPO	60 min	30 min	60 min
<b>AC DE COMPETICIÓN</b>	No aplica	No aplica	M84
VOLUMEN	No aplica	50 µl	No aplica
AGITACIÓN	No aplica	5 min	No aplica
TIEMPO	No aplica	Se incuba con los sueros y los controles	No aplica
<b>SOLUCION DE LAVADO</b>	PBS-Tween	No especificada	PBS-Tween
<b>CICLOS LAVADO</b>	3 ciclos	3 ciclos	4 ciclos
<b>AC DE DETECCIÓN</b>	Anti-IgG1 monoclonal conjugado a peroxidasa	Anti-IgG1 monoclonal conjugado a peroxidasa	Anti-M84 de cabra conjugado a peroxidasa
VOLUMEN	100 µl	100 µl	100 µl
TEMPERATURA	37 °C	Ambiente	37 °C
TIEMPO	60 min	30 min	60 min
<b>CICLOS LAVADO</b>	3 ciclos	3 ciclos	4 ciclos
<b>SUBSTRATO</b>	Tetrametyl-bencidina	Tetrametyl-bencidina	Tetrametyl-bencidina
VOLUMEN	100 µl	100 µl	100 µl
TEMPERATURA	Ambiente	Ambiente	Ambiente
TIEMPO	10 min	10 min	15 min
<b>FRENADO</b>	Solución con ácido sulfúrico	No especificada	Solución con ácido sulfúrico
VOLUMEN	50 µl	50 µl	No
<b>LECTURA DO</b>	450 nm	450 nm	450 nm



### 3. Otros test utilizados en el estudio

#### 3.1. Aglutinación en microplaca con rosa de Bengala (AMRB)

El rosa de Bengala es un reactivo coloreado que tiñe de color rosa a las brucelas enteras. A las bacterias teñidas se les añade tampón lactato como fase de dispersión para elaborar el tampón rosa de Bengala que actúa como Ag en la prueba. Este Ag marcado se añade al suero problema. Si en éste hay Ac específicos frente a *Brucella* spp., la formación del complejo Ag-Ac origina un precipitado en el fondo del pocillo de color rosa intenso (figura 22). Si no hay Ac, el Ag está disperso por todo el pocillo y el contenido aparece teñido de un rosa suave. El fundamento de la técnica es el mismo que el de la RB y presenta dos ventajas sobre ésta: la primera es la posibilidad de automatizar la dispensación de los sueros y del reactivo y la segunda la mejora en la lectura e interpretación de los resultados. La técnica fue desarrollada por el LNR-B y se ha utilizado de forma continuada para la erradicación de la brucelosis en Galicia, desde el año 1990.

##### 3.1.1. Protocolo para la realización del test

- Dispensar 25µ del suero a testar en una placa de fondo en U mediante una pipeta.
- Dispensar 25µ de suero control positivo y suero control negativo en las dos posiciones de la placa de ensayo destinadas a tal efecto.
- Dispensar 25µ de tampón rosa de Bengala en cada pocillo con una pipeta o con un dispensador.
- Agitar durante 1min  $\pm$ 10 seg entre 500 y 700 rpm en un agitador vibrador orbital para microplacas.
- Incubar a 37 $\pm$ 1°C durante 8min  $\pm$ 15s agitando entre 60 y 100 rpm. Para ello se puede disponer de un agitador vibrador orbital dentro de la propia estufa de incubación.
- Centrifugar a 20g durante 5min  $\pm$ 10s.
- Lectura inmediata, mediante espejo lector para microplacas, con buena luz.

##### 3.1.2. Expresión e interpretación de resultados

###### Validación de la placa

Una placa se valida si se obtienen los siguientes valores con los controles:

- Control positivo: aglutinación más o menos intensa en función de la cantidad de Ac presentes en el suero.
- Control negativo: sin aglutinación

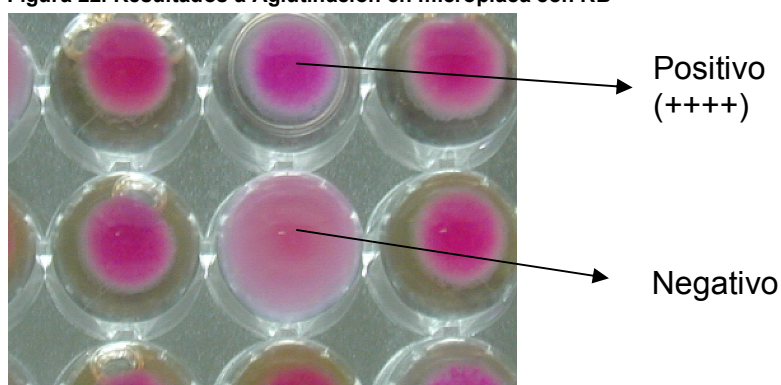
## Interpretación del resultado

Para la interpretación de los resultados se aplicarán los criterios establecidos en la tabla 29.

Tabla 29. Expresión y significado del resultado de los ensayos con la AMRB

Resultado	Expresión del resultado	Características de la aglutinación
<b>Positivo fuerte</b>	++++	Botón de aglutinación muy neto y sobrenadante muy transparente.
<b>Positivo intermedio</b>	+++	Botón neto y sobrenadante algo rosado, pero transparente
<b>Positivo débil</b>	++	Botón difuso y sobrenadante rosa opalino
<b>Positivo muy débil</b>	+	Existe aglutinación, pero no se llega a formar botón
<b>Negativo</b>	N	Líquido rosa homogéneo sin ningún tipo de aglutinación

Figura 22. Resultados a Aglutinación en microplaca con RB



### 3.2. Fijación de complemento (FC)

Una de las características más importantes de los complejos Ag-Ac es que tienen la capacidad de activar el sistema del complemento después de formarse. Las enzimas liberadas tras esta activación pueden producir importantes efectos sobre los agentes infecciosos entre los que cabe citar los siguientes: lisis celular, opsonización, fagocitosis, quimiotaxis, aglutinación y procesos inflamatorios. Por otro lado, alguno de los componentes del complemento tiene la capacidad de actuar como hemolisinas siendo capaces de lisis a los eritrocitos. En las infecciones por *Brucella* spp. se producen Ac específicos frente a los Ag de superficie de la

bacteria dando lugar a la formación de complejos Ag-Ac capaces de activar al complemento. La técnica de la FC se basa en esta característica.

En primer lugar se procede a la inactivación de los sueros problema para eliminar el complemento endógeno mediante un calentamiento al baño María a  $56\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  entre 30 y 40 minutos. A continuación se añade Ag de *Brucella* spp. y complemento externo en cantidades conocidas. Si el suero tiene Ac frente a *Brucella* spp. se formarán complejos Ag-Ac que fijará el complemento añadido.

En la siguiente fase se añade sistema hemolítico para visualizar las reacciones. Se trata de un complejo Ag-Ac formado por eritrocitos como Ag y una IgG antieritrocito como Ac.

Si el suero no tiene Ac específicos no reacciona con el Ag brucelar y el complemento quedará libre en el medio. Al añadir el sistema hemolítico el complemento libre lisa los glóbulos rojos y la mezcla adquiere un color rosa pálido homogéneo. Si por el contrario hay Ac específicos reaccionan con el Ag brucelar y el complejo formado fija el complemento del medio. Al añadir el complejo hemolítico no se producirá la lisis de los glóbulos rojos que aglutinarán en el centro del pocillo dando lugar al botón típico de la respuesta positiva a la FC (figura 23).

El protocolo utilizado en este estudio es el recomendado por el LNR-B de acuerdo a lo dispuesto en el Real Decreto 1047/2003 sobre programas de erradicación de enfermedades.

## Validación del ensayo

Un ensayo será válido si se cumplen los requisitos especificados en la tabla 30.

**Tabla 30. Requisitos para la validación de un ensayo de FC**

		Hemólisis	Poder anticomplementario
Control positivo		Según título conocido $\pm 1$ título	No
Control negativo		100%	No
Sueros en estudio		Según Ac presentes (Positivo-Negativo)	Los que tengan, resultado desconocido
Control mezcla hemolítica		0%	No
Control de Ag	Ausencia poder hemolítico	0%	
	Ausencia poder anticomplementario	100%	No
Control de complemento	2	100%	
	1,5	100%	
	1	100 % o trazas de eritrocitos en suspensión	
	0,75	0% a 75%	
	0,5	0% a 50%	

## Interpretación del resultado

- Una reacción es negativa cuando presenta sobrenadante rojizo y no presenta sedimentación de eritrocitos en el fondo (figura 23).
- Una reacción es positiva cuando presenta un sedimento de eritrocitos en el fondo del pocillo (figura 23). El resultado positivo se cuantifica por el título y el grado de hemólisis (tabla 31).

Tabla 31. Cuantificación del resultado positivo a la prueba de FC

Fijación de complemento	Descripción de la reacción	% Hemólisis
++++	Sobrenadante traslúcido o blanco opaco, en el fondo botón de depósitos de eritrocitos	0
+++	Sobrenadante rojizo en un 25% de intensidad, en el fondo un depósito claro de eritrocitos	25
++	Sobrenadante rojizo en un 50% de intensidad, en el fondo un depósito tenue de eritrocitos	50
+	Sobrenadante rojizo en un 75% de intensidad, en el fondo un depósito muy tenue de eritrocitos	75
Negativo	Sobrenadante rojizo claro y ausencia de depósito de eritrocitos	100

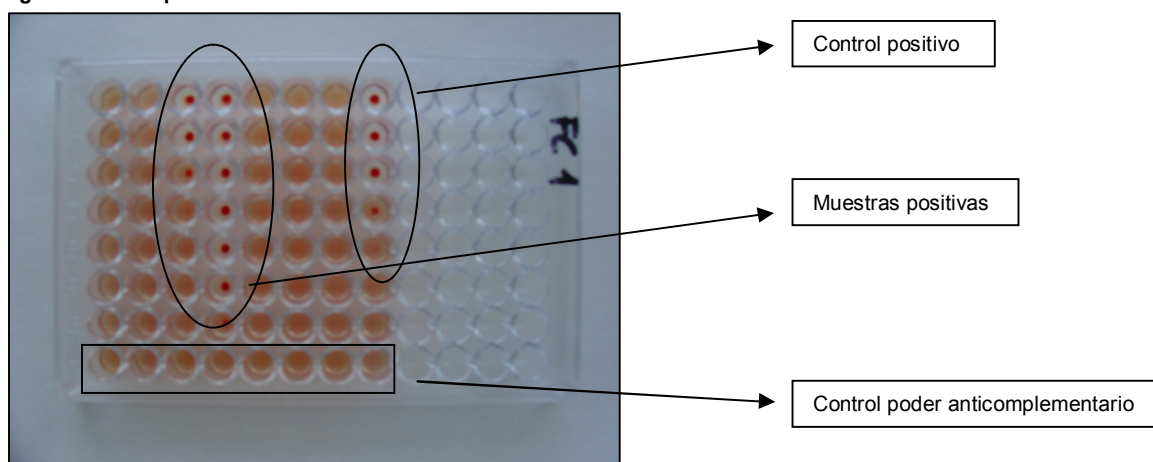
## Expresión del resultado en Unidades CEE (UIFC)

Según la Directiva 64/434/CEE y el Reglamento 535/2002, la dilución del suero y el grado de hemólisis se convertirán en un valor único según lo indicado en tabla 32.

Tabla 32. Unidades UIFC para FC

UNIDADES UIFC PARA LA EXPRESIÓN DEL RESULTADO				
Grado de hemólisis				
Dilución del suero	25%	50%	75%	100%
1/2	NEGATIVO	10	12	15
1/4	15	20	20	25
1/8	35	40	45	50
1/16	65	80	95	110
1/32	125	160	180	200
1/64	250	320	375	425
1/128	500	640	750	850
1/256	1000	1250	1500	1700

Figura 23. Microplaca con una FC



### 3.3. Aislamiento en medios selectivos

El aislamiento es la prueba definitiva que confirma la infección causada por *Brucella* spp. por lo que está considerada como la prueba “gold etandard”. Sin embargo, el crecimiento en medios de cultivo selectivos es moderadamente lento pudiendo llegar a superar las dos semanas (LNR-B, 2000).

Esta técnica fue aplicada a las muestras obtenidas de los animales sacrificados como sospechosos de estar infectados por *Brucella* spp. durante la realización de las CSG, a partir de los resultados obtenidos con las pruebas serológicas de rutina o de la situación epidemiológica, con respecto a la enfermedad de las explotaciones con las que estos animales tenían algún tipo de relación. Los resultados obtenidos con el aislamiento permitió clasificar dos grupos de animales: animales en los que se obtuvo aislamiento (232 animales, ver tabla 37) y animales en los que no se obtuvo aislamiento (108 animales, ver tabla 37).

La recogida de las muestras se realizó en los mataderos autorizados para el sacrificio de animales positivos a brucelosis durante la realización de la CSG o bien en las explotaciones de origen antes de que los animales fueran enviados a sacrificio. Las principales muestras para el aislamiento de las bacterias son las siguientes: ganglios retromamarios, ganglios ilíacos, bazo, ganglios retro faríngeos, ganglios parotídeos, mama y ubre (Verger, 1994).

En este estudio, de todos los animales investigados se obtuvieron alguna o todas de las siguientes muestras:

- Leche extraída lo más asépticamente posible.
- Parénquima mamario.
- Pezón seccionado a nivel de su base.
- Ganglios linfáticos retromamarios
- Bazo.
- Ganglios linfáticos de la cabeza: parotídeos y retrofaríngeos.

A partir de las muestras indicadas se realizaron cultivos en medios selectivos de Farrel y de Thayer-Martin (figura 24 y 25). Las colonias obtenidas se analizaron mediante las pruebas indicadas en la tabla 33 para su identificación. Posteriormente se sometieron a técnicas de PCR para confirmación de resultados. Por último, los aislamientos obtenidos se remitieron al LNR-B para su identificación y tipificación.

**Tabla 33. Pruebas para identificación de bacterias de *Brucella* spp.**

<i>Pruebas de identificación</i>	<i>Resultado de la Identificación de las bacterias</i>	
	<i>Positivo a Brucella spp.</i>	<i>Negativo a Brucella spp.</i>
<b>Morfología colonias (según medio)</b>	Blancas Grisáceas	Se descartan las colonias no redondeadas
<b>Oxidasa</b>	Azul intenso del papel en la zona de colocación de las bacterias	Se mantiene el color azul pálido de la mancha de la gota en el papel
<b>Ureasa</b>	Viraje a color rosa	Se mantiene el color amarillento
<b>Aglutinación</b>	Aglutinación con el antisuero de <i>B. abortus</i> y/o <i>B. mellitensis</i> y no en la solución salina	No hay aglutinación con antisuero ni en la solución salina
<b>Gram</b>	Gram (-): colonias de color rojo	Gram (+): colonias de color azul
<b>Stamp</b>	Cocobacilos pequeños rojos	

**Figura 24. Crecimiento de *Brucella* spp. en el medio selectivo de Thayer- Martin**



**Figura 25. Crecimiento de *Brucella* spp. en el medio selectivo de Farrel**



*Origen de las fotos: LASAPAGA*

## 4. Verificación interna de la AMRB

### 4.1. Estimación de la exactitud y de la precisión

La estimación de la exactitud se realizó en condiciones de repetibilidad (tabla 36). La precisión no se estimó al no poder obtener resultados expresados numéricamente. Los diferentes patrones, las diluciones de uso y el número de réplicas de cada dilución y de cada patrón utilizadas en este estudio se incluyen en la tabla 24. Estos patrones fueron analizados a la AMRB, a la RB, según se describe en el MPDOIE, y a la prueba de AMRB de doble suero. Esta última técnica se diferencia de la AMRB descrita en este estudio en que el volumen de suero utilizado es de 50µ en vez de 25µ.

EL PSNR-Pos se incluyó en cada ensayo a la dilución 1/25, por ser el límite de positividad. Además, para este patrón se obtuvieron diluciones con el suero negativo de campo, en base dos, desde la 1/25 hasta la 1/400. Cada una de estas diluciones se analizó con cada test. El suero Abadín (patrón cuaternario interno positivo) y el suero positivo bovino 2 se diluyeron en base dos con el suero negativo de campo desde la 1/2 hasta la 1/16.384. Todas estas diluciones fueron analizadas con los tres test citados. Los resultados de las diluciones del suero Abadín con la AMRB se compararon con los resultados obtenidos con el PSNR-Pos en el límite de positividad con el objetivo de estimar la dilución de uso como patrón cuaternario interno positivo.

Adicionalmente, en cada uno de los ensayos se incluyó una muestra del PSNR-Neg y dos del suero negativo de campo.

Para la verificación de este test todas las muestras utilizadas se dispensaron en una única placa. Esta placa se analizó en **tres** días diferentes y cada día se analizó con los test correspondientes. El número de resultados posibles para los patrones y sus diluciones se indican en la tabla 34.

**Tabla 34. Número de resultados posibles para las diluciones de uso de cada patrón en la AMRB**

Patrón o control	Nº de resultados	Patrón o control	Nº de resultados	Patrón o control	Nº de resultados
PSNR-Pos 1/25	6	Abadín 1/32	3	S. bovino2 1/32	3
PSNR-Pos 1/50	3	Abadín 1/64	3	S. bovino2 1/64	3
PSNR-Pos 1/100	3	Abadín 1/128	3	S. bovino2 1/128	3
PSNR-Pos 1/200	3	Abadín 1/256	3	S. bovino2 1/256	3
PSNR-Pos 1/400	3	Abadín 1/512	3	S. bovino2 1/512	3
<b>TOTAL PSNR-Pos</b>	<b>18</b>	Abadín 1/1024	3	S. bovino2 1/1024	3
PSNR-Neg	3	Abadín 1/2048	3	S. bovino2 1/2048	3
S. negativo campo	6	Abadín 1/4096	3	S. bovino2 1/4096	3
<b>TOTAL negativos</b>	<b>9</b>	Abadín 1/8192	3	S. bovino2 1/8192	3
		Abadín 1/16384	3	S. bovino2 1/16384	3
		<b>TOTAL Abadín</b>	<b>33</b>	<b>TOTAL otro positivo</b>	<b>33</b>

La estimación de la exactitud se realizó aplicando el criterio de porcentaje de falsos positivos y de falsos negativos (Gabinete de Servicio para la Calidad, 2009). Los análisis de diluciones seriadas del suero Abadín permiten establecer su dilución óptima de uso como patrón cuaternario interno positivo. El uso de este patrón a la dilución correspondiente en las placas de rutina permite evaluar la exactitud del método en condiciones de repetibilidad intermedia.

## **4.2. Participación en ensayos interlaboratorio**

Desde el inicio de las CSG en el año 1990, el Laboratorio de Sanidade e Producción Animal de Galicia (LASAPAGA) ha participado en todos los ensayos interlaboratorio organizados por el LNR-B. En este estudio se evaluaron los resultados obtenidos en los últimos siete años.

Este tipo de ensayos permite evaluar la capacidad de los laboratorios en condiciones de reproducibilidad. El laboratorio organizador prepara una serie de muestras de valor conocido que son distribuidas de forma ciega a los laboratorios participantes. Una vez realizados los ensayos, los laboratorios participantes comunican los resultados al laboratorio organizador y éste emite un informe en el que incluye los resultados correctos e incorrectos obtenidos por cada laboratorio participante.

El número de muestras y de laboratorios participantes fue variable según los años. En la tabla 39 se indican el número de laboratorios participantes en cada ensayo y el número de muestras utilizadas en cada uno de ellos. En todos los ensayos evaluados las muestras debían ser investigadas en tres días diferentes a RB y a AMRB. Adicionalmente, en los años 2007 y 2008 se incluyó en la relación de ensayos la AMRB de doble suero.

Para la evaluación de los ensayos de intercomparación se utilizó el porcentaje de resultados falsos positivos y de falsos negativos obtenidos por el laboratorio con cada uno de los test recomendados por el laboratorio organizador que fue el LNR-B, excepto en un caso (tabla 40).

## **5. Verificación interna de los test de ELISA**

### **5.1. Estimación de la exactitud y de la precisión en condiciones de repetibilidad**

Los patrones, las diluciones de uso y el número de réplicas de cada dilución y de cada patrón utilizado en la verificación de los test de ELISA se incluyen en la tabla 24. Las condiciones de realización de estos ensayos se indican en la tabla 36.

Previamente a la verificación se realizaron ensayos para la formación del personal y para la puesta a punto del método con muestras de campo positivas y negativas seleccionadas al azar del banco general de muestras existentes en el laboratorio.

A continuación se procedió a la realización de los estudios de verificación interna de los test. En cada una de las placas de ELISA y para cada test, se incluyeron los controles



suministrados por los fabricantes, todos ellos por duplicado. Los tres ELISAs incluían un control positivo y un control negativo. Adicionalmente, el ELISAc incluía un control positivo débil y un control del conjugado. Las peculiaridades de estos controles se indican en el apartado referido al procedimiento de ensayo de cada test.

Los otros controles y sus diluciones utilizados en la verificación de los dos ELISAi y en el ELISAc fueron los mismos en todos los casos. Para este fin, se preparó un volumen suficiente de cada patrón y de cada dilución para realizar **cuatro** ensayos en dos días diferentes y seguidos, con cada uno de los test. Estos ensayos se consideraron realizados en condiciones de repetibilidad. El número de resultados posibles para cada patrón y sus diluciones, y para cada test, se indican en la tabla 35.

**Tabla 35. Número de resultados posibles para las diluciones de uso de cada patrón y para cada test**

Patrón o control	Nº de resultados	Patrón o control	Nº de resultados	Patrón o control	Nº de resultados para cada control
PSNR-Pos 1/32	4	Abadín 1/32	8	S. positivos A,B y C 1/32	8
PSNR-Pos 1/256	4	Abadín 1/64	8	S. positivos A,B y C 1/64	8
<b>TOTAL PSNR-Pos</b>	<b>8</b>	Abadín 1/128	8	S. positivos A,B y C 1/128	8
		Abadín 1/256	8	S. positivos A,B y C 1/256	8
PSNR-Neg	8	Abadín 1/512	8	S. positivos A,B y C 1/512	8
S. negativo campo	8	Abadín 1/1024	8	S. positivos A,B y C 1/1024	8
S. negativo comercial	8	Abadín 1/2048	8	S. positivos A,B y C 1/2048	8
<b>TOTAL negativos</b>	<b>24</b>	Abadín 1/4096	8	S. positivos A,B y C 1/4096	8
		Abadín 1/8192	8	S. positivos A,B y C 1/8192	8
		Abadín 1/16384	8	S. positivos A,B y C 1/16384	8
		<b>TOTAL Abadín</b>	<b>80</b>	<b>TOTAL otros positivos</b>	<b>80</b>

El PSNR-Pos se analizó a **dos** diluciones de uso: 1/32 y 1/256. En cada placa se incluyó **una** muestra de cada dilución y se estimaron los valores medios obtenidos con todos los ensayos realizados. La estimación del PP, o del PI según el test, de las diluciones no incluidas expresamente en los ensayos se realizó mediante un cálculo matemático. El modelo de este cálculo se indica en otro párrafo de este apartado. El número de resultados posibles se indican en la tabla 35.

A partir de una muestra pura de suero Abadín se obtuvieron 10 diluciones en base dos con un suero comercial de vacuno negativo, desde la 1/32 hasta la 1/16.384. Las 10 diluciones se incluyeron por duplicado en cada ensayo. Para cada dilución se obtuvieron ocho resultados. Para cada uno de los test de ELISA y para todas y cada una de las alícuotas analizadas en cada ensayo se calculó el PP medio, o el PI medio según el test, a partir de los valores de la DO. Con los valores medios obtenidos para cada dilución se calculó la media, la *SD* y el CV. El valor de éste último no debería superar el 10% en ningún caso. Los valores medios obtenidos entre todos los ensayos se representaron en dos tipos de gráficos: un gráfico correspondiente a los valores medios del PP, o el PI medio según el test, y otro correspondiente al CV medio de esos mismos

valores, también según el test. Para cada dilución del suero Abadín, el número de resultados posibles se indica en la tabla 35.

Los resultados obtenidos con las diluciones del suero Abadín se utilizaron para determinar las diluciones de uso de este suero como patrón positivo fuerte y débil en las placas de ELISA. Los valores medios de las diluciones se compararon con los valores medios obtenidos con el PSNR-Pos. En los ELISAI, se seleccionó la dilución con un PP más próximo al del COff, con resultado positivo, para usarla como control positivo débil. Como control positivo fuerte se seleccionó la dilución cuyo PP fuese el doble del valor del COff. Independientemente de la existencia de posibles diferencias entre los test, las diluciones seleccionadas deberían ser las mismas en todos ellos y la del control positivo débil se debería obtener por dilución de la del positivo fuerte. En el ELISAc se seleccionó una primera dilución cuyo valor del PI estuviese próximo al 50% y la otra dilución sería aquella cuyo PI permitiese obtener un rango de valores, junto con la primera seleccionada, que incluyera el PI obtenido con el control positivo débil del test. La dilución más alta debería de obtenerse por dilución en base dos de la más baja.

El cálculo del PP, o del PI según el test, de una determinada dilución de cualquier de los patrones, no utilizada expresamente en los ensayos, se realizó mediante un cálculo matemático. Para ello, se tomaron como referencia los valores del PP, o del PI, de las dos diluciones sucesivas que contuviesen la dilución a estimar. Las diluciones intermedias se obtuvieron en base dos, a partir de la dilución más baja. El rango entre los valores de las diluciones seleccionadas se dividió a partes iguales un número de veces igual al número de diluciones intermedias a estimar, más uno. Por ejemplo, una única dilución entre la 1/2048 y la 1/1024 sería la 1/1536. El valor estimado del PP de esta dilución sería igual al PP de la 1/1024 menos el PP de la 1/2048 dividido entre dos.

Para una mejor valoración de los test, se incluyeron en el estudio **tres** muestras positivas adicionales cuyas características se especifican en la tabla 23. Se obtuvieron 10 diluciones de cada suero en base dos con un suero comercial de vacuno negativo, desde la 1/32 hasta la 1/16.384. Cada dilución se dispuso por duplicado en cada placa para obtener 8 resultados de cada una de ellas con cada test de ELISA. Para cada uno de estos test y para todas y cada una de las alícuotas analizadas en cada ensayo se calculó el PP medio, o el PI medio según el test, a partir de los valores de la DO obtenida en los análisis de cada alícuota. Con los valores obtenidos para cada dilución de cada muestra se calculó la media, la SD y el CV. El valor de éste último no debería superar el 10% en ningún caso. Los valores medios obtenidos se representaron en dos tipos de gráficos: un gráfico correspondiente a los valores medios del PP, o del PI según el test, y otro para el CV medio de esos mismos valores, también según el test. Para cada dilución de los sueros positivos, el número de resultados posibles se indica en la tabla 35.

En todas las placas analizadas se incluyeron **tres** muestras negativas por duplicado correspondientes al PSRN-Neg, al suero negativo comercial de vacuno y al suero negativo

bovino de campo. El número total de resultados que se pueden obtener para cada test y para cada control se indican en la tabla 35.

## **5.2. Estimación de la precisión en condiciones de repetibilidad intermedia**

Para la estimación de la precisión en condiciones de repetibilidad intermedia se utilizaron dos tipos de muestras: los controles suministrados con el test por el fabricante a la dilución de uso correspondiente y el suero Abadín a dos diluciones, una como positivo fuerte y otra como positivo débil. Los gráficos de control se corresponden con la representación gráfica de los valores de estos controles y permitieron una estimación visual de la precisión del método en condiciones de repetibilidad intermedia (tabla 36).

Se elaboraron dos tipos de gráficos siguiendo las recomendaciones de la FAO/OIE para el uso de IQC en test de ELISA (Crowther, 2009). El primer tipo de gráfico correspondió al DDD de la FAO/OIE e incluyó los valores brutos o normalizados, según los casos, obtenidos con los controles en cada placa de ensayo. El segundo tipo de gráfico correspondió al SDC de la FAO/OIE e incluyó los valores obtenidos con los controles, pero agrupados por día de ensayo. En la realización de este estudio no fue posible utilizar el número de réplicas de cada control recomendadas por la FAO/OIE por lo que los gráficos obtenidos se adecuaron a los controles utilizados (figura 20). De los controles suministrados con los test se seleccionó el utilizado para la estimación del PP, o del PI según el test: el control positivo para los ELISAI y el control negativo para el ELISAc, en un gráfico, por su correspondencia con el control positivo de los ELISAI, y el control del conjugado, en otro gráfico, por ser el utilizado para la estimación del PI en este tipo de ELISAs.

Los controles suministrados con los test cumplieron una doble función. Por un lado, se utilizaron para establecer el COff de cada placa, clasificando las muestras en positivas y negativas, y por otro, se utilizaron para validar cada placa según las indicaciones del fabricante. Este último deberá suministrar los valores de DO y el CV de los controles para cada lote de reactivos. Los controles del test se utilizaron por duplicado en cada una de las placas.

Se elaboraron dos tipos de gráficos DDD. En uno de ellos se incluyó la DO del control positivo del test, para los ELISAI, y el control negativo del test para el ELISAc. Los valores de referencia para estos controles fueron los suministrados por el fabricante.

En el otro gráfico DDD, se incluyeron los PP, o PI según el test, de las dos diluciones del suero Abadín utilizadas en cada placa. Se utilizó una única muestra, por lo que no se pudieron representar las barras de error asociadas a los valores obtenidos, ni se representaron los valores de DO brutos por el probable CV superior al 10%. Los valores de referencia utilizados fueron los obtenidos en los ensayos de estimación de la exactitud y de la precisión en condiciones de repetibilidad de la verificación interna de los test de ELISA.

En ambos tipos de gráficos, la variación de los controles se consideró adecuada para un rango entre la  $M$  de referencia  $\pm$  dos  $SD$ . Para un CV máximo del 10% dos  $SD$  se corresponden con el 20% de la media. Este valor se obtuvo a partir de la fórmula del CV. Aplicando este valor, el rango de variación sería igual a la media  $\pm$  el 20% de la media.

Además de los gráficos DDD, también se elaboraron dos gráficos SDC. En este caso, los valores representados se correspondieron con los valores medios obtenidos en cada día de ensayo y con cada test, para los controles correspondientes. En el primero de ellos se representaron los valores de DO del control positivo del test, para los ELISAI, el control negativo del test, para el ELISAc y las dos diluciones de uso del suero Abadín. Para cada control y para cada día de ensayo, los valores obtenidos incluyeron las barras de error correspondientes.

**Tabla 36. Verificación interna de los ELISAs y de la AMRB según las condiciones de realización de los ensayos**

Condiciones de realización de los ensayos	Parámetros y/o estudios de verificación	ELISAs	AMRB
Repetibilidad	Veracidad con controles positivos (exactitud)	Si	Si
	Veracidad con controles negativos (exactitud)	Si	Si
	Precisión intra e interplacas con controles positivos 2 días seguidos	Si	
	Comparación con otros métodos (*)		Si
Repetibilidad intermedia	Evaluación del control interno de calidad con las placas de la extensión de la validación	Si	Si
	Elaboración de gráficos de control con las placas de extensión de la validación	Si	
Reproducibilidad	Ensayos interlaboratorio		Si

## 6. Extensión de la validación de los test de ELISA

Para la estimación del rendimiento de los test se utilizó el criterio de comparación absoluto y el criterio de comparación relativo. En el primer caso, todos los test se compararon con muestras cualificadas por la prueba “gold standard” para brucelosis: el aislamiento de *Brucella* spp. en tejidos procedentes de animales sospechosos para animales positivos y la selección de los negativos a partir de la situación sanitaria de las explotaciones (tabla 37).

Para la aplicación del criterio de comparación relativo, además de las muestras anteriores, se seleccionaron muestras de grupos adicionales con la intención de cubrir la mayor parte de las situaciones epidemiológicas que se observan durante la realización rutinaria de las CSG (tabla 37). Todas estas muestras se cualificaron a partir de los resultados obtenidos con la AMRB y la FC utilizados en serie.

Una vez que todas las muestras estuvieron analizadas a los test seleccionados se estimaron los siguientes parámetros para ambos criterios de comparación: Se y Sp diagnósticas, valores predictivos, índice de validez, razón de verosimilitud, curvas ROC, IY e índice *Kappa*.

Con la estimación del rendimiento de los test aplicando el criterio de comparación relativo se pretendió conocer su comportamiento en condiciones reales de campo y por eso se incluyeron sueros cualificados por la AMRB y la FC, pero de los que se desconocía, en muchos de ellos, su situación verdadera con respecto a la enfermedad. Los grupos seleccionados incluyeron las situaciones epidemiológicas más significativas que pueden afectar al comportamiento de los test.

Por este motivo pareció recomendable evaluar si los test se comportaban de forma similar en cada grupo o si existía algún grupo en el que se produjeran la mayor parte de las discrepancias entre test. Para estos objetivos se realizaron tres tipos de estudios. El primero de ellos consistió en la elaboración de tablas en las que se compararon los resultados positivos y negativos obtenidos con cada test en relación al resultado positivo o negativo obtenido con la AMRB y la FC en serie. En el segundo estudio, también para cada grupo, se elaboraron gráficos de dispersión entre los ELISAs y la FC que no incluyeron los resultados a la AMRB por no estar expresados en forma numérica. El objetivo de estos gráficos fue comprobar de forma visual el grado de correlación entre los resultados de los test.

Finalmente, en el tercer estudio se verificó como afectaría a cada grupo la modificación del COff de los ELISAs. Para ello, las muestras se reagruparon en tres nuevos grupos. El primero de ellos estaba formado por las muestras consideradas positivas e incluía a los sueros positivos de animales con aislamiento (grupo A), los sueros positivos de animales sin aislamiento (grupo C) y los sueros de la primera y de la segunda extracción con conversión según la cualificación establecida por la AMRB y la FC en serie (grupo B). El segundo grupo estaba formado por los sueros considerados negativos e incluía a los sueros negativos de animales oficialmente indemnes (grupo D), los sueros con PA (grupo F) y los sueros negativos acompañantes de infectados (grupo E) a excepción de los seis sueros en los que no se pudo estimar su situación epidemiológica. El tercer grupo estaba constituido por los sueros falsos positivos (grupo G).

### 6.1. Obtención de sueros para la extensión de la validación

La obtención de los sueros para la estimación de los parámetros de rendimiento de los test de ELISA se realizó durante la aplicación del *Programa de Erradicación de la Brucelosis* bovina, ovina y caprina en Galicia. Este programa, incluido en las clásicas CSG, es aplicado por los SSVVOO con un doble fin: la cualificación sanitaria de las explotaciones y la erradicación de la enfermedad.

El programa de erradicación de brucelosis en bovino contempla la investigación serológica del 100% de los animales mayores de 12 meses. Los sueros obtenidos (figura 26) se envían al laboratorio y se analizan con el test de la AMRB, en caso de resultado positivo se analizan a la FC. La interpretación de los resultados corresponde a la del uso en serie de estos test considerando positivos aquellos sueros con resultado positivo al primero (AMRB) y al segundo (FC). Una vez obtenido un resultado positivo, los SSVVOO realizan una evaluación de la situación epidemiológica de la explotación con el sacrificio de los animales sospechosos y un seguimiento del resto de los animales de la explotación con nuevas tomas de muestras y análisis posterior de éstas. Con relativa frecuencia eran necesarios vacíos sanitarios, cada vez menos frecuentes debido a descenso de la prevalencia de la enfermedad en Galicia.



Figura 26. Muestra de suero recibida en el laboratorio

Los grupos de muestras obtenidas aparecen reflejados en la tabla 37. La sistemática para la colección de los sueros fue diferente según el grupo. Para el de sueros negativos de animales oficialmente indemnes primero se seleccionaron explotaciones candidatas con la máxima cualificación sanitaria a brucelosis. Si a continuación los análisis realizados en la CSG daban un resultado negativo, se coleccionaban los sueros para el estudio. En este grupo se incluyeron algunos sueros que presentaron resultado positivo a AMRB, pero resultado negativo a FC y, por tanto, sueros de animales considerados libres de la enfermedad que no afectaron a la situación sanitaria de la explotación. Para el resto de grupos, las muestras se seleccionaron después de la realización de los ensayos de la CSG sin tener en cuenta la situación sanitaria previa de la explotación de origen. Sin embargo, para la inclusión de los sueros en uno u otro grupo, además

del resultado obtenido en los ensayos, también se consideró la situación sanitaria de la explotación. Ahora bien, sólo se coleccionaron aquellos sueros en los que el volumen disponible y el estado de la muestra fueran el adecuado.

**El procedimiento de conservación de los sueros fue el siguiente:** una vez seleccionados, los sueros se centrifugaron a 3.500 rpm durante 3 min para la eliminación de los restos de glóbulos rojos presentes en suspensión. El sobrenadante se almacenó congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$  en tres alícuotas de 500 $\mu\text{l}$  para cada suero (Moorhouse y Hugh-Jones, 1981). Previamente a la realización de los ensayos de ELISA se descongelaron las alícuotas necesarias y se trasvasaron 250 $\mu\text{l}$  de suero a una microplaca para facilitar la automatización de los ensayos.

## **6.2. Tamaño de la muestra para la estimación de los parámetros de rendimiento**

Los criterios aplicados para la estimación del tamaño de muestra necesario en relación a la Se y la Sp diagnóstica del test, el error permitido y al intervalo de confianza se fijaron a partir de las recomendaciones de Jacobson (1998). El número de las muestras seleccionadas para la estimación de los parámetros de rendimiento se indican en la tabla 37. La obtención de estas muestras presentó un grado de dificultad diferente según el grupo. De esta forma, fueron relativamente fáciles de obtener las muestras de los grupos de sueros negativos de animales oficialmente indemnes, de sueros negativos acompañantes de infectados y de sueros positivos de animales sin aislamiento. Sin embargo, para el resto de grupos la obtención de muestras fue muy difícil por lo que el número de las seleccionadas se corresponde con el total de existentes en el laboratorio en el momento previo al inicio de los ensayos.

Para la validación de un test de diagnóstico puede resultar adecuada la utilización de 300 muestras positivas y 1.000 negativas (OIE, 2006a). En este estudio, el número de muestras positivas de animales con aislamiento fue de 232, además de otras 108 del grupo de sueros positivos de animales sin aislamiento. Por tanto, el número total de muestras positivas sería de 340 en el estudio de comparación de los ELISAs aplicando el criterio relativo. El grupo de negativos está formado por 2.107 animales procedentes de establos oficialmente indemnes a la enfermedad. Este número se corresponde aproximadamente, en relación al número de positivos, a una población con un 10% de prevalencia.

## **6.3. Definición de los grupos de muestras utilizados en la extensión de la validación**

Como se indicó anteriormente, los sueros utilizados para la determinación de los parámetros de rendimiento de los test se clasificaron, en distintos grupos, en función de los resultados obtenidos con el aislamiento y con los test utilizados en la CSG (AMRB y FC) y en relación a la situación epidemiológica de los animales de procedencia. Un suero se consideró

positivo a brucelosis con un resultado positivo a AMRB e igual o mayor a 20 UIFC a la prueba de FC según se indica en el RD 1047 de 2003. Los grupos establecidos fueron los siguientes (tabla 37):

- A. Sueros positivos de animales con aislamiento: pertenecían a animales en los que se pudo aislar *B. abortus* a partir de vísceras y/o de leche (figura 27).
- B. Sueros de animales con conversión del título de Ac: pertenecían a animales con resultado negativo según los criterios de la CSG en una primera extracción y con resultado positivo, según los mismos criterios, en un segundo análisis separado por lo menos tres semanas. Se incluyeron sólo aquellos casos en los que se disponía de las dos extracciones. Estos animales pertenecían a explotaciones en las que se aisló *B. abortus* en algún animal compañero de los seleccionados. Por tanto, se trata de animales muy probablemente infectados (figura 28). En este estudio se incluyeron las muestras de la primera y de la segunda extracción.
- C. Sueros positivos de animales sin aislamiento: pertenecían a animales en los que no se pudo aislar *B. abortus*, pero convivían en la misma explotación con animales en los que sí se aisló el agente. Los sueros presentaban resultado positivo a AMRB y a FC por lo que se puede suponer que estarían probablemente infectados (figura 29).
- D. Sueros negativos de animales oficialmente indemnes: los animales seleccionados pertenecían a explotaciones en las que no hubo indicios epidemiológicos o clínicos de la enfermedad en los 7 años anteriores a la toma de la muestra. Este dato fue verificado a través de las bases de datos de sanidad animal de la Xunta de Galicia, estando las explotaciones cualificadas como oficialmente indemnes a brucelosis. Por razones obvias, estos animales no pudieron ser investigados a la prueba de aislamiento.
- E. Sueros negativos acompañantes de infectados: sueros con resultado negativo al análisis en serie de las pruebas aplicadas en las CSG oficiales (AMRB y FC). Sin embargo, convivían en la misma explotación con otros en los que se aisló *B. abortus*. Algunos de ellos presentaban resultado positivo a AMRB, pero no fueron confirmados como positivos a FC (título 0 ó menor de 20 UIFC). Para profundizar en la situación epidemiológica de estos sueros, en relación a la brucelosis, se revisaron los datos existentes en la aplicación de sanidad animal de la Xunta de Galicia de los animales de procedencia. Las muestras se recolectaron en los seis primeros meses del 2003. A principios del 2004 estaban presentes en las explotaciones 47 de estos animales, por lo que los sueros, recolectados con 6 mese de antelación como mínimo, se consideraron como negativos. Los 19 restantes se eliminaron durante el año 2003 por ser positivos a brucelosis o por vacíos sanitarios de las explotaciones de origen debidos a la enfermedad. Con estos animales se realizó un segundo estudio en el que se tuvo en cuenta: el número de ensayos negativos obtenidos entre 2002 y 2003, el tiempo transcurrido entre la toma de muestras y el último ensayo con resultado negativo y el tiempo transcurrido entre la toma de muestras y el análisis con resultado positivo o con la fecha en la que se decidía el vacío sanitario de la explotación.



Todos los sueros de animales eliminados por vacíos sanitarios, y con análisis previos negativos, se consideraron negativos. También se consideraron negativos los sueros de animales eliminados como positivos, pero en los que el tiempo transcurrido entre la toma de muestras y el resultado positivo fue superior a 60 días. A modo de resumen, de los 66 animales, 60 se consideraron negativos y para los 6 restantes no existen datos suficientes que permitan garantizar que fueran negativos en el momento de la toma de muestras.

- F. Sueros con PA: pertenecían a animales cuyos sueros presentaban PA a FC cuando fueron testados en fresco. Estos sueros fueron recogidos al azar durante la realización de la CSG y, por tanto, no pertenecen a explotaciones relacionadas epidemiológicamente con brotes de la enfermedad. Los 40 sueros seleccionados pertenecen a 35 explotaciones diferentes (tabla 37). Estos sueros se consideraron en todos los casos como negativos.
- G. Sueros falsos positivos: pertenecían a animales con resultado positivo a AMRB y a FC en un primer análisis. Procedían de explotaciones sin evidencias clínicas ni epidemiológicas de brucelosis. El resto de acompañantes en la explotación presentaban resultado negativo a AMRB o positivo a este test y negativo a FC. En posteriores análisis, realizados sobre muestras obtenidas por lo menos 30 días después de la primera extracción, el título a FC se mantenía o era menor al obtenido en el primer ensayo. En este estudio se incluyeron las muestras de la segunda extracción. Las muestras de esta extracción se analizaron a FC independientemente del resultado a AMRB. En este grupo se incluyeron las muestras con resultado positivo a FC de la segunda extracción (figura 30).

**Tabla 37. Sueros de referencia para estimación de los parámetros de rendimiento de los ELISAs**

GRUPO DE SUEROS	Nº DE SUEROS DEL GRUPO	Nº DE EXPLOTACIONES DE ORIGEN
Grupo A. Sueros positivos de animales con aislamiento	232	89
Grupo B. Sueros de animales con conversión del título de Ac	80 (40x2)	13
Grupo C. Sueros positivos de animales sin aislamiento	108	59
Grupo D. Sueros negativos de animales oficialmente indemnes	2.107	177
Grupo E. Sueros negativos acompañantes de infectados	66	19
Grupo F. Sueros con poder anticomplementario	40	35
Grupo G. Sueros falsos positivos	31	31
<b>TOTALES</b>	<b>2.664</b>	<b>423</b>

Figura 27. Distribución de frecuencias de los sueros positivos de animales con aislamiento según título a FC (grupo A)

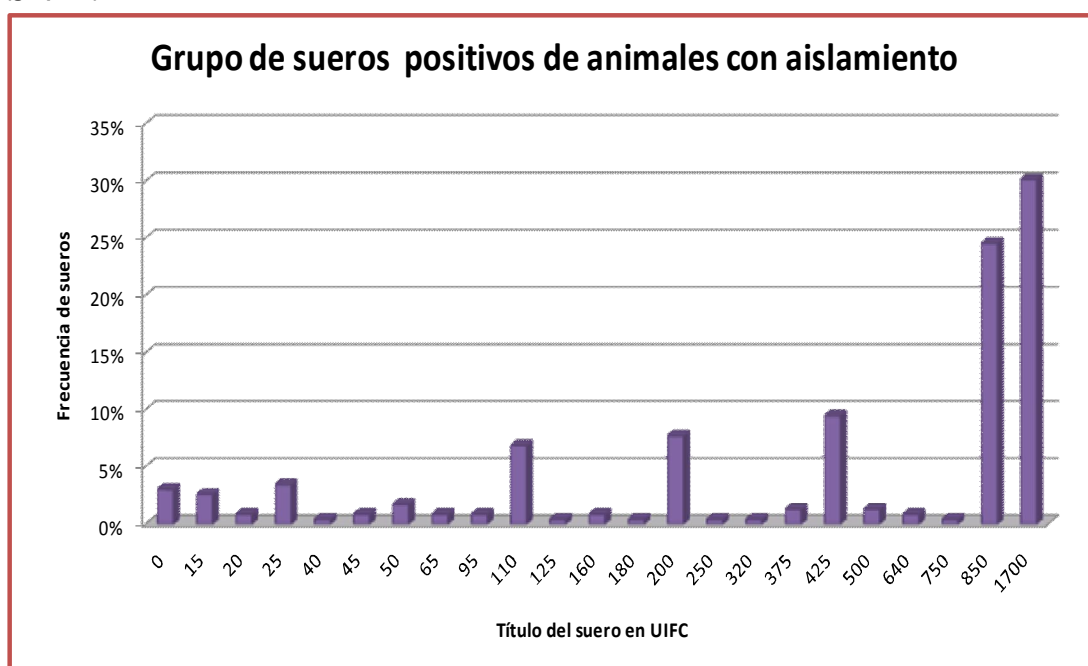
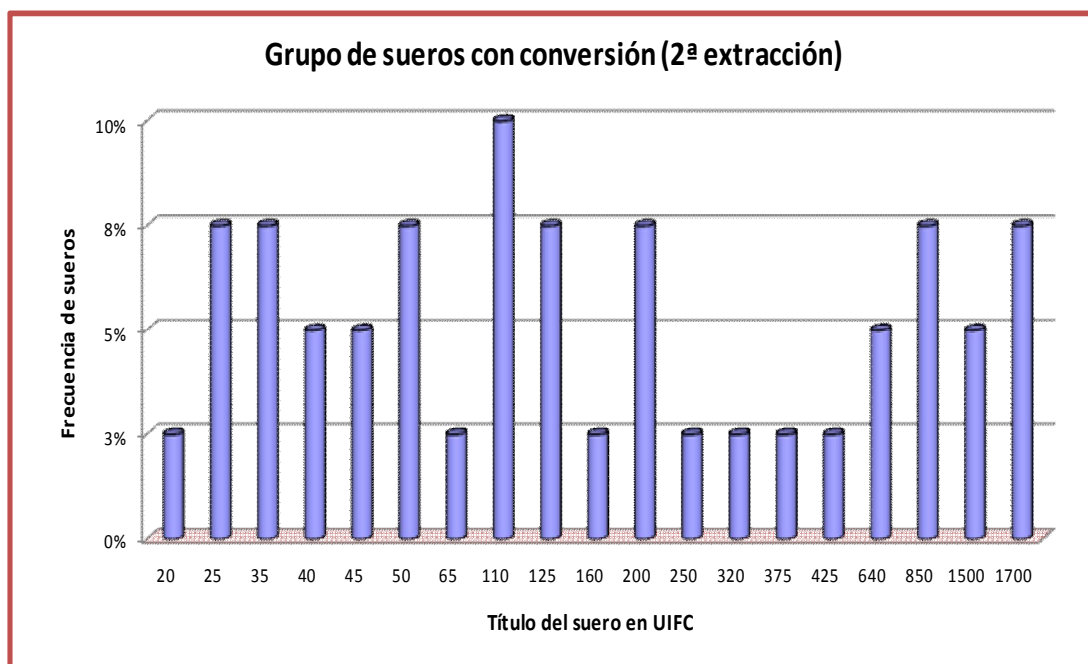
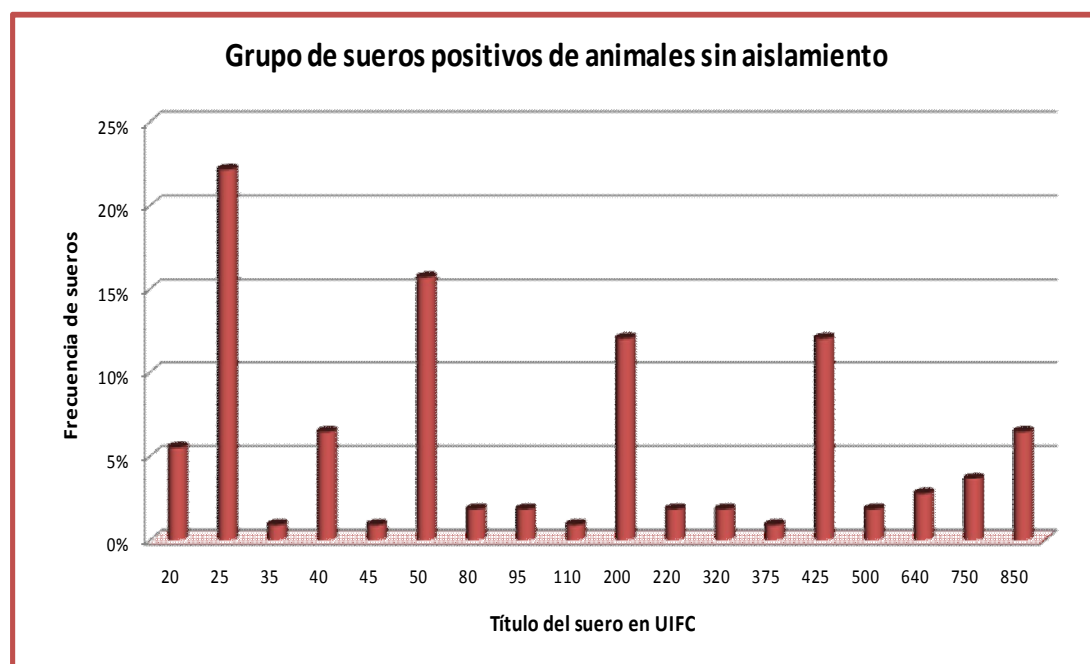


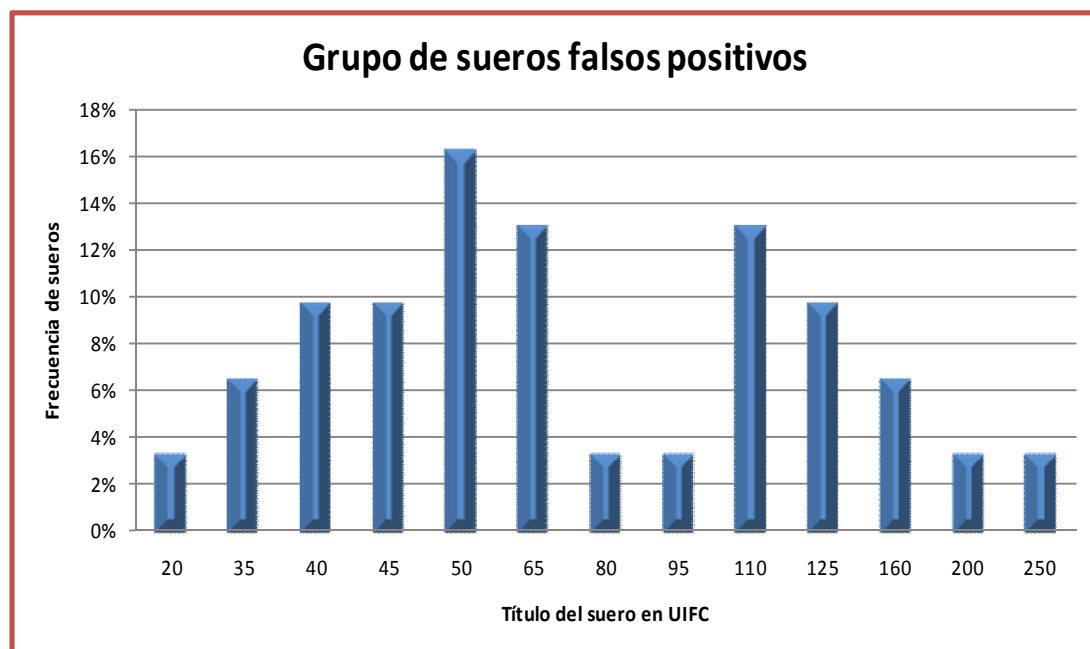
Figura 28. Distribución de frecuencias de la segunda extracción de los sueros con conversión según título a FC (grupo B)



**Figura 29. Distribución de frecuencia de los sueros positivos de animales sin aislamiento según título a FC (grupo C)**



**Figura 30. Frecuencia de los sueros falsos positivos según título a FC (grupo G)**



## 7. Tratamiento estadístico de los datos

Se utilizaron las siguientes aplicaciones informáticas para la gestión y el tratamiento estadístico de los datos y los resultados:

1. Base de datos Microsoft Access 2000. Se utilizó para almacenar los datos asociados a las muestras como la identificación, el código de la explotación de origen y el grupo al que pertenecía. También se utilizó para almacenar los resultados de todos los ensayos. A través de las consultas correspondientes se realizó la selección de las muestras para la elaboración de las tablas de contingencia de 2x2 utilizadas en el cálculo de los parámetros de rendimiento. Finalmente, se utilizó para la elaboración de las tablas de resultados por grupos de muestras.
2. Hoja de cálculo Microsoft Excel 2007. Se utilizó para la elaboración de las tablas incluidas en el texto y para la elaboración de las figuras incluidas en los resultados de verificación interna y control interno de calidad para test de ELISA.
3. EPIDAT 3.1 de la Consellería de Sanidade de la Xunta de Galicia y de la Organización Panamericana de la Salud. Se utilizó para el cálculo del tamaño de la muestra utilizada en la estimación de los parámetros de rendimiento de los ELISAs y para la estimación de los siguientes parámetros de rendimiento: Se, Sp, índice de validez, valores predictivos positivos y negativos, IY y las razones de verosimilitud positivas y negativas. También se utilizó para la estimación de la prevalencia real y para la obtención de las curvas ROC.
4. Win Episcopo 2.0. Se utilizó para la estimación del índice *Kappa*.
5. Minitab 15. Se utilizó para la elaboración de los gráficos de dispersión incluidos en los resultados por grupos de muestras.

# **I V. Resultados**

## **1. Verificación interna de la AMRB**

### ***1.1. Estimación de la exactitud***

Los resultados obtenidos con las muestras de valor conocido sirvieron para evaluar la exactitud de la AMRB y, al mismo tiempo, comparar este test con la RB y con la AMRB de doble suero (tabla 38).

Los tres test fueron capaces de detectar todas las muestras positivas como tales en todos los ensayos realizados y, por tanto, no se produjeron resultados falsos negativos. Resulta de especial relevancia los resultados obtenidos con el PSNR-Pos a la dilución 1/25, que es la dilución de uso recomendada por el LNR-B. Las otras muestras positivas también fueron detectadas como tales, en todos los ensayos, por lo menos a la dilución 1/128 para el suero Abadín y a la dilución 1/32 para el suero positivo bovino 2.

Los tres test también fueron capaces de clasificar adecuadamente todas las muestras negativas incluidas en los ensayos, por lo que no se produjeron resultados falsos positivos.

Por lo menos en algún ensayo, todos los test fueron capaces de detectar como positivas algunas diluciones del PSNR-Pos más allá del límite de detección recomendado por el LNR-B. En relación a este control, la AMRB y la RB detectan hasta la misma dilución como positiva (1/50), por lo que no se aprecian diferencias entre la Se de ambos test. Con respecto al suero positivo bovino 2 estos dos test también detectan hasta la misma dilución como positiva (1/64). Sin embargo, tanto para el PSNR-Pos como para el suero positivo bovino 2, la AMRB con doble suero es capaz de detectar diluciones bastante más bajas como positivas que la AMRB y la RB.

Los ensayos realizados con los tres test permitieron establecer la dilución máxima que eran capaces de detectar del suero Abadín para ser utilizado como patrón cuaternario en el control interno de calidad. La dilución más baja detectada como positiva con la AMRB y con la RB fue la **1/128**, mientras que para la AMRB de doble suero lo fue la **1/1024**.

Para la AMRB también se evaluó la exactitud en condiciones de repetibilidad intermedia. Para ello, se incluyó el suero Abadín y el suero negativo bovino de campo en los ensayos de los sueros usados para la extensión de la validación. Para el suero Abadín, la dilución de uso seleccionada fue la **1/50**, que correspondía aproximadamente a una dilución menos de la máxima detectada en los estudios de verificación interna. En todos los ensayos se obtuvo un resultado positivo para esta dilución. De igual forma, con el suero negativo bovino de campo se obtuvieron resultados negativos en todos los ensayos.

Tabla 38. Resultados obtenidos en tres días para la verificación interna de AMRB, RB y AMRB de doble suero

	Resultado (Para los controles positivos diluidos, se indica la última dilución con resultado positivo)		
	AMRB	RB	AMRB con doble suero
Identificación del suero	Día 1/Día 2/Día 3	Día 1/Día 2/Día 3	Día 1/Día 2/Día 3
PSRN-Pos (dilución límite 1/25)	POS – POS – POS	POS – POS – POS	POS – POS – POS
PSRN-Pos (dilución 1/25 a 1/400)	1/25 – 1/50 – 1/25	1/50 – 1/25 – 1/25	1/50 – 1/100 – 1/100
Suero Abadín	1/128 – 1/128 – 1/128	1/128 – 1/128 – 1/128	1/256 – 1/1024 – 1/1024
Pos Bovino 2	1/32 – 1/64 – 1/32	1/32 – 1/64 – 1/32	1/128 – 1/256 – 1/256
PSNR-Neg	Neg – Neg – Neg	Neg – Neg – Neg	Neg – Neg – Neg
Suero negativo bovino de campo	Neg – Neg – Neg Neg – Neg – Neg	Neg – Neg – Neg Neg – Neg – Neg	Neg – Neg – Neg Neg – Neg – Neg

## 1.2. Resultados de ensayos interlaboratorio

Los ensayos interlaboratorio permiten evaluar el comportamiento de los test en condiciones de reproducibilidad. En este estudio se incluyeron los resultados obtenidos desde el año 2001 al 2008. El número de laboratorios participantes y el número de muestras analizadas se reflejan en la tabla 39. En el año 2002 y 2005 el LNR-B no organizó ensayos por lo que no hay datos disponibles. Los datos del interlaboratorio del año 2002 corresponden a un ensayo organizado entre los tres laboratorios de sanidad animal existentes en Galicia.

Tabla 39. Datos de participación en ensayos interlaboratorios para AMRB, RB y AMRB de doble suero

Año	2001	2002	2003	2004	2006	2007	2008	Totales
Laboratorio organizador	LNR-B	LASAPAGA	LNR-B	LNR-B	LNR-B	LNR-B	LNR-B	
Muestras totales	20	10	20	20	20	20	20	130
Muestras positivas	14	8	14	14	14	14	12	90
Muestras negativas	6	2	6	6	6	6	8	40
Laboratorios participantes	49	3	50	50	50	50	47	299

Tabla 40. Resultados obtenidos en los ensayos interlaboratorio para la AMRB, la RB y la AMRB de doble suero

	Muestras	Repeticiones	Falsos negativos	
			nº	%
AMRB	90	270	0	0,0%
RB	82	246	0	0,0%
AMRB de doble suero	26	78	0	0,0%
<b>TOTAL</b>	<b>198</b>	<b>594</b>	<b>0</b>	<b>0,0%</b>
Muestras negativas	Muestras	Repeticiones	Falsos positivos	
			nº	%
AMRB	40	120	0	0,0%
RB	38	114	0	0,0%
AMRB de doble suero	14	42	0	0,0%
<b>TOTAL</b>	<b>92</b>	<b>276</b>	<b>0</b>	<b>0,0%</b>

En la tabla 40 se incluyen el número de muestras y el número de ensayos realizados con cada uno de los tres métodos propuestos: AMRB, AMRB de doble suero y RB. En la tabla se puede apreciar que la AMRB fue el único test con el que se investigaron todas las muestras positivas y negativas incluidas en los ensayos interlaboratorio. Para los otros dos, el número de muestras analizadas fue menor. No se obtuvieron resultados discrepantes con respecto al valor esperado con ninguno de los test. Por tanto, se cumplen sobradamente los porcentajes de falsos positivos y de falsos negativos propuestos como aceptables en este tipo de estudios, incluso para los menos favorables, a pesar de estar investigando métodos de cribado (tabla 21).

## 2. Verificación interna y control interno de calidad para test de ELISA

### 2.1. Estimación de la exactitud y de la precisión en condiciones de repetibilidad

Los principales resultados obtenidos se incluyen la tabla 41. Los tres test clasificaron adecuadamente las dos diluciones del PSRN-Pos: positiva la dilución **1/32** y negativa la dilución **1/256**. A partir de los resultados de estas dos diluciones se estimó el valor esperado de la dilución de uso recomendada por el LNR-B para cada test de ELISA mediante un cálculo matemático. El ELISAI Svanova detectó como positiva la dilución 1/100, estimada por cálculo matemático, y la dilución 1/450 como negativa, por extrapolación del resultado negativo de la dilución 1/256. El ELISAI Idexx no detectó como positiva la dilución 1/100, estimada por cálculo matemático, pero el

resultado de 78,51 está muy próximo al COff 80 del test. Si fue capaz de detectar la dilución 1/450 como negativa, por extrapolación del resultado negativo de la dilución 1/256.

Tabla 41. Valores medios de PP y del PI de estándares y muestras utilizadas para elaborar los gráficos de control

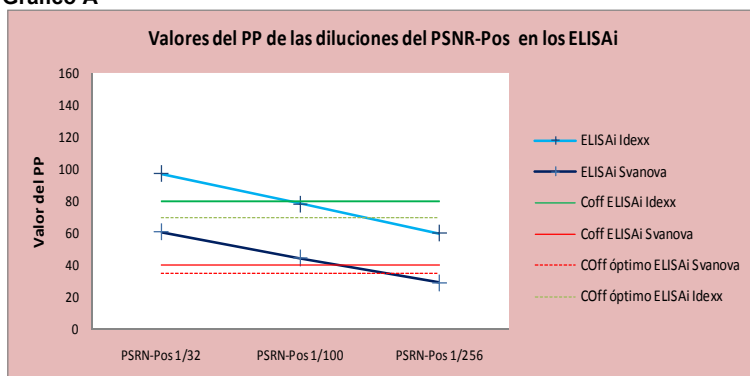
	Uso en la verificación	ELISAI Svanova (PP)	ELISAI Idexx (PP)	ELISAc Svanova (PI)
COff	Clasifica positivos y negativos en cada placa	40	80	30
PSRN-Pos 1/32	Dilución de uso para ELISAc	60,97	97,17	38,54
PSRN-Pos 1/64	Dilución de uso para ELISAc	--	--	30,31 (*)
PSRN-Pos 1/100	Dilución de uso para ELISAI	44,5 (*)	78,51 (*)	--
PSRN-Pos 1/256	Dilución adicional para ELISAs	29,1 (**)	59,85 (**)	13,86 (**)
Suero Abadín 1/2048	Estimación de la dilución 1/1600 ELISAI	38,32	91,53	--
Suero Abadín 1/1024	Estimación de la dilución 1/1600 ELISAI	60,16	116,58	--
Suero Abadín 1/1600	Valor de referencia en los gráficos de control ELISAI	49,24 (*)	104,06 (*)	--
Suero Abadín 1/512	Estimación de la dilución 1/400 ELISAI	79,95	134,30	--
Suero Abadín 1/256	Estimación de la dilución 1/400 ELISAI	93,34	144,98	--
Suero Abadín 1/400	Valor de referencia en los gráficos de control ELISAI	86,65 (*)	139,64 (*)	--
Control positivo débil ELISAc	Valor de referencia para la selección de las diluciones 1/100 y 1/50 ELISAc			65,54
Suero Abadín 1/128	Estimación de la dilución 1/100 ELISAc	--	--	44,48
Suero Abadín 1/64	Estimación de la dilución 1/100 ELISAc	--	--	68,37
Suero Abadín 1/100	Valor de referencia en los gráficos de control ELISAc	--	--	56,43 (*)
Suero Abadín 1/64	Estimación de la dilución 1/50 ELISAc	--	--	68,37
Suero Abadín 1/32	Estimación de la dilución 1/50 ELISAc	--	--	86,89
Suero Abadín 1/50	Valor de referencia en los gráficos de control ELISAc	--	--	77,63 (*)

Los valores con (\*) se obtuvieron mediante un cálculo matemático. Los valores (\*\*) corresponden a la dilución de uso del PSNR-Pos utilizada en todos los test en sustitución de la dilución débil del estándar recomendada por el LNR-B. Los valores en color negro corresponden a los obtenidos para las diluciones de uso recomendadas del PSNR-Pos por el LNR-B. Los valores en color amarillo se utilizaron para la estimación de otros valores. Los valores en color rojo se utilizaron como referencia en la elaboración de alguno de los gráficos de control. Los valores rodeados con un círculo no fueron plenamente satisfactorios.



**Figura 31. Representación de los valores del PP y de PI para los ELISAI y ELISAc del PSNR-Pos y del suero Abadín.**

**Gráfico A**

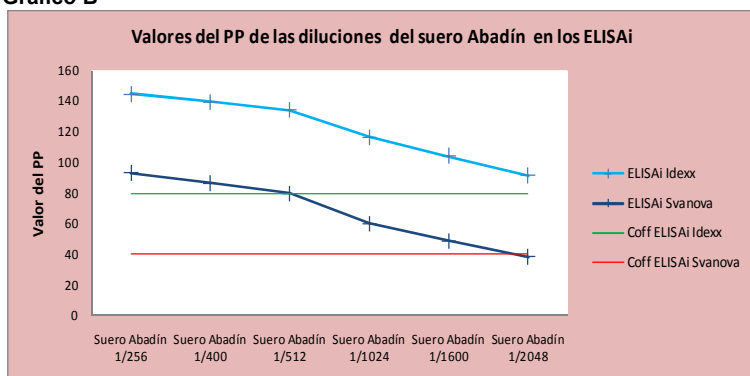


En estos cuatro gráficos se representan los valores del PP y del PI obtenidos con los ELISAI y con el ELISAc, respectivamente, para los sueros PSNR-Pos y para el suero Abadín, en los ensayos de verificación interna y control interno de calidad para los test de ELISA. Los valores representados en los gráficos son los incluidos en la tabla 41.

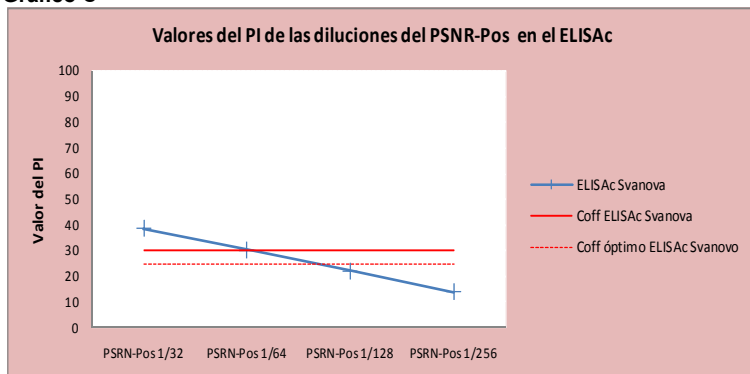
Para los ELISAI (gráfico A), los dos sueros presentan un comportamiento similar. Con el PSNR-Pos se obtuvo un valor muy próximo al Coff en ambos test, con la diferencia de que para el ELISAI Idexx se sitúa por debajo del Coff y, por tanto, con resultado negativo, cuando debería presentar un resultado positivo. Sin embargo, este valor está muy próximo al Coff. Para el ELISAI Svanova el valor es el esperado.

Para estos mismos ELISAs el comportamiento del suero Abadín también es similar, observándose una Se analítica ligeramente superior en el ELISAI Idexx (gráfico B).

**Gráfico B**



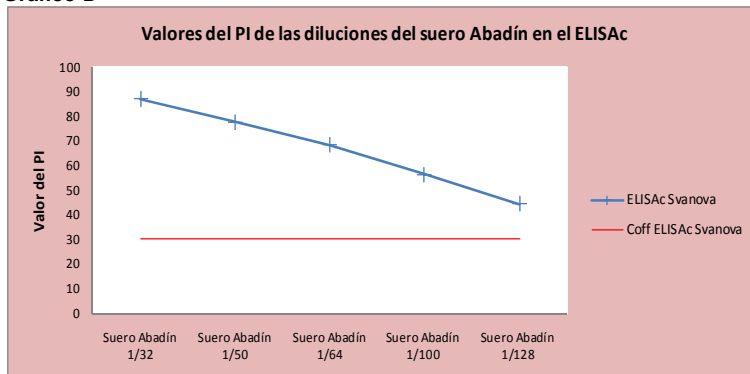
**Gráfico C**



Con el ELISAc se puede observar que para la dilución 1/64 del PSNR-Pos el valor obtenido está prácticamente en el Coff, pero el resultado obtenido es positivo cuando debería ser negativo (gráfico C).

En el gráfico D se puede observar el comportamiento del suero Abadín con el ELISAc. Aunque la representación gráfica de estos ofrece una imagen con una pendiente parecida a la obtenida con los ELISAI, en realidad en este test es mucho más pronunciada ya que las diluciones representadas no son las mismas. En los ELISAI se representa un número de diluciones reducido del rango de detección de positivos mientras que para el ELISAc se representan todas las diluciones del rango de detección de positivos.

**Gráfico D**



Los Coff óptimos de cada test se obtuvieron de la combinación del valor obtenido para el PSNR-Pos y de los valores de las AUC obtenidas por el método de comparación absoluto.

El ELISAc detectó como positiva la dilución 1/32. La dilución 1/64, obtenida por cálculo matemático, se detectó como positiva cuando debería obtenerse un resultado negativo. Tanto el resultado de la dilución 1/32 (38,54), pero sobre todo el de la 1/64 (30,31) están muy próximos al valor 30 del COff. El PI de la dilución 1/64 se obtuvo de forma matemática a partir de las diluciones 1/32 y 1/256 obteniéndose una recta cuando se representan los valores en un gráfico (figura 31). Sin embargo, el comportamiento esperado de un ELISAc no es una recta si no una curva muy pronunciada, como se puede observar para el suero Abadín en la figura 35. Probablemente, con el uso tal cual de esta dilución en los estudios de verificación se obtendría un resultado negativo, que era el esperado.

Con respecto a los resultados obtenidos con el suero Abadín, los ELISAi fueron capaces de detectar como positivas diluciones mucho más elevadas que el ELISAc. En concreto, estos ELISAs detectaron como positiva de forma inequívoca la dilución **1/1024** y en el límite de positividad la dilución **1/2048**. Sin embargo, el ELISAc solo detectó como positiva hasta la dilución **1/128** (figuras 32, 34 y 36). Esta diferencia en la capacidad de clasificar diluciones como positivas del mismo suero también se observó con el PSRN-Pos (tabla 41).

La curva de dosis/respuesta para ambos tipos de test presentó la pendiente hacia la derecha, cuando en el ELISAc la curva debería ser para la izquierda. Esto se explica debido a que los datos representados están normalizados. Si en las graficas se representasen los valores brutos de DO, en el ELISAc la pendiente de la curva sería la esperada. También se puede apreciar que la pendiente del ELISAc fue bastante más acusada que la de los ELISAi y el rango de detección de positivos es mayor para éstos que para el ELISAc, como era de esperar (figuras 33, 35 y 37).

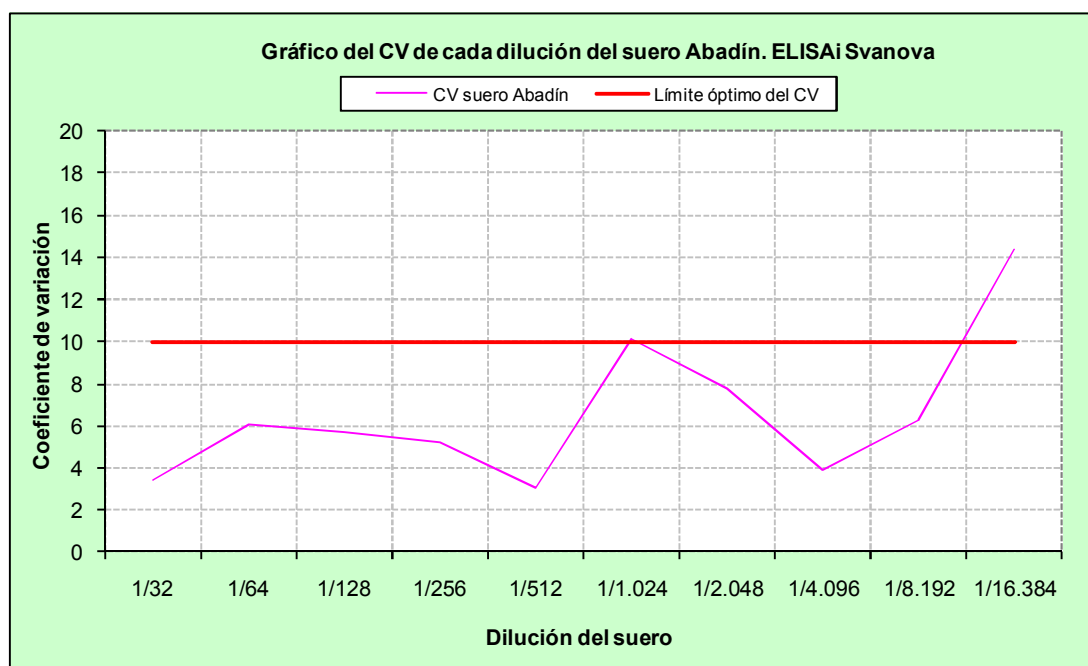
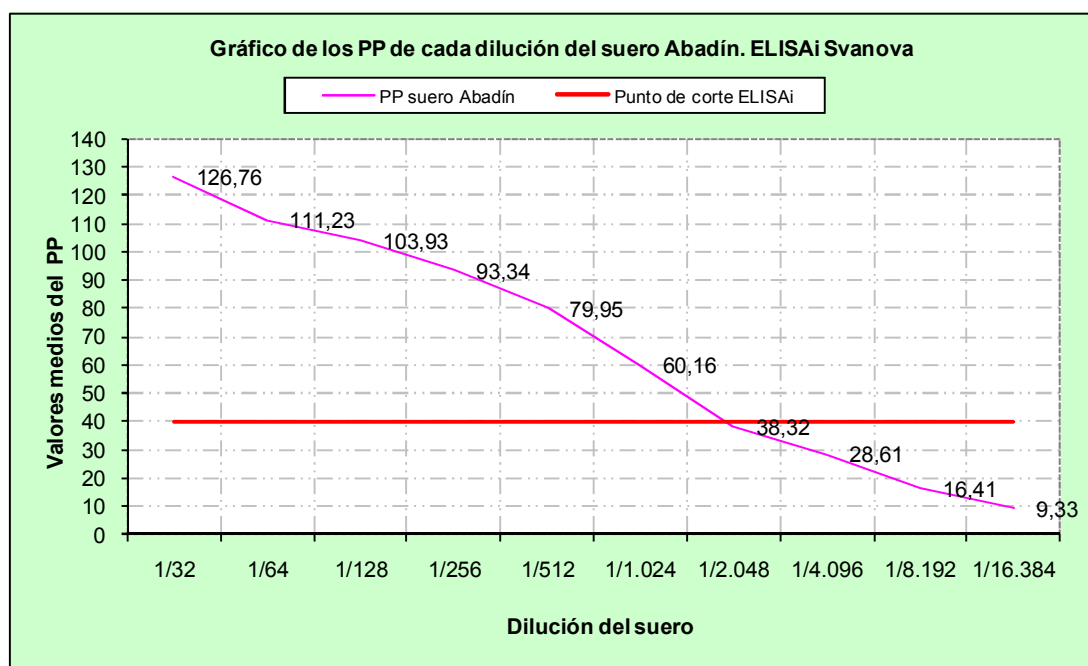
Con respecto al CV medio obtenido con los PP, o los PI según el test, del suero Abadín se observa que es bastante mayor en el ELISAc que en los ELISAi a las mismas diluciones (figuras 32, 34 y 36). Esta circunstancia también es normal ya que al disminuir los valores de DO se incrementan los valores del CV. El descenso de los valores de la DO fueron más acusados en el ELISAc ya que el suero se hace negativo con un menor número de diluciones y los valores de la DO son más bajos que en los ELISAi para la misma dilución. En los ELISAi los valores del CV se mantienen por debajo del 10% prácticamente para todas las diluciones. En el ELISAc el CV sobrepasa el 10% a partir de la dilución **1/512**. A esta dilución el suero ya se considera negativo y los valores de la DO y del PI son bajos. A partir de la dilución siguiente (**1/1028**) las variaciones de ambos valores prácticamente se mantienen invariables.

A partir de la curva dosis/respuesta del suero Abadín se estimaron las diluciones de uso de este suero como patrón cuaternario (figuras 32, 34 y 36). Las diluciones seleccionadas para esta estimación en todos los ELISAs se incluyen en la tabla 41. Todas las estimaciones se realizaron mediante el cálculo matemático descrito en el apartado de estimación de la exactitud y de la precisión en condiciones de repetibilidad de la verificación interna de los test de ELISA. Para todos los test se utilizaron cuatro diluciones con el objetivo de determinar dos valores de uso del suero Abadín, uno como positivo débil y otro como positivo fuerte. En los ELISAi se utilizaron

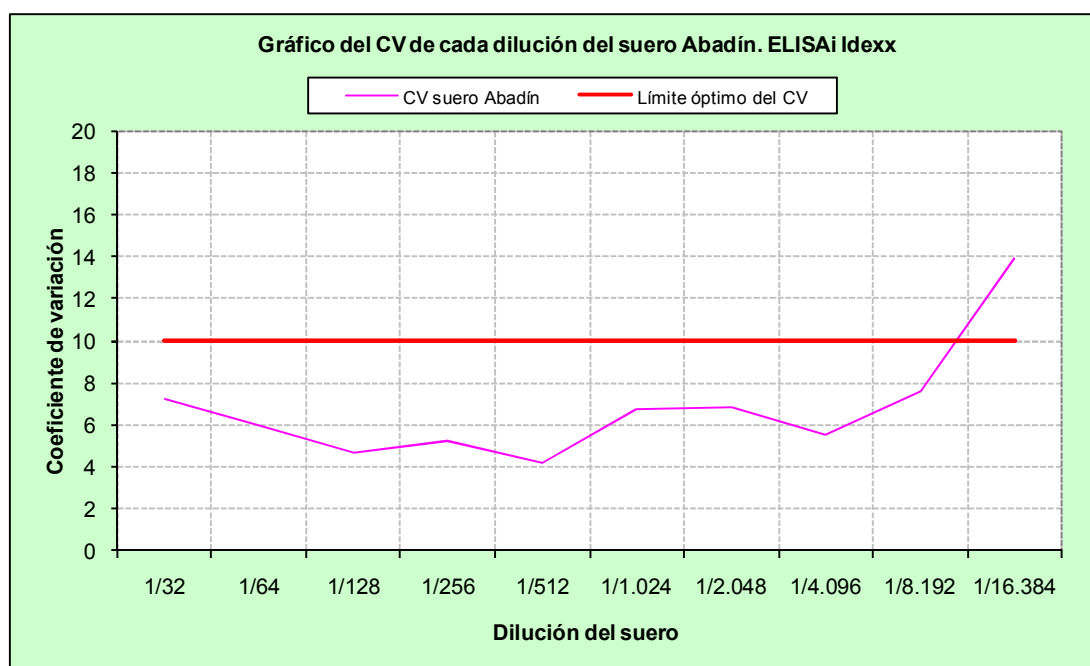
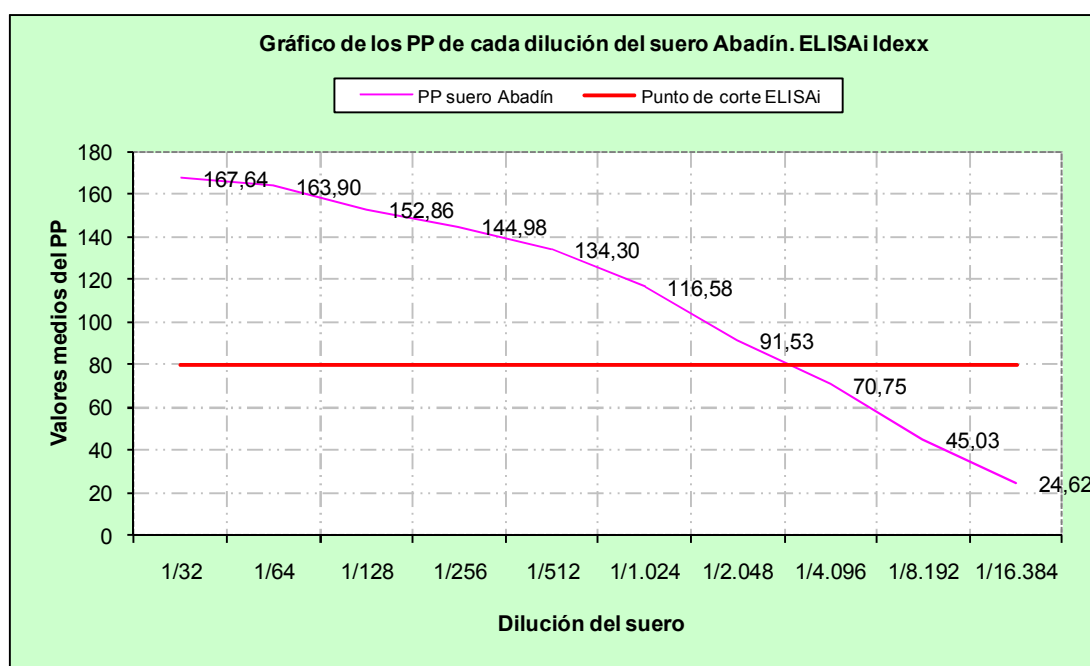
como referencia las diluciones 1/2048 y la 1/1024, para obtener el control positivo fuerte, y la dilución 1/512 y la 1/256, para obtener el control positivo débil. En el ELISAc se utilizaron las diluciones 1/32 y la 1/64, para obtener el control positivo fuerte, y la 1/64 y la 1/128, para obtener el control positivo débil. Los resultados obtenidos con todas las diluciones seleccionadas fueron positivos a los test correspondientes. Estos resultados se compararon con el PSNR-Pos. Todos los valores del PP, o del PI según el test, seleccionados estaban por encima de los valores obtenidos con el PSNR-Pos y presentaban una diferencia evidente entre los valores de las diluciones bajas y los de las diluciones altas.

En los ELISAi, la dilución con un PP más próxima al COff fue la 1/2048. En el ELISAi Svanova con esta dilución se obtuvo un resultado inmediatamente por debajo del COff y, por tanto, negativo. Con el objetivo de utilizar una dilución positiva inequívocamente a ambos test, pero próxima al COff para usar como positivo débil, se seleccionó la dilución 1/1600. El valor estimado del PP de esta dilución se obtuvo por el método del cálculo matemático, si bien el valor obtenido correspondería estrictamente a la dilución 1/1536. Como dilución de uso como positivo fuerte se seleccionó la 1/400. El valor del PP de esta dilución se estimó también por el método del cálculo matemático a partir del valor obtenido con la dilución 1/512 y la 1/256. El valor obtenido correspondería estrictamente a la dilución 1/384. Para el ELISAi Svanova el valor obtenido del PP de 86,65 es, aproximadamente, el doble del COff del test. Sin embargo, para el ELISAi Idexx el valor obtenido de 139,64 está alejado del doble del COff de este test (tabla 41). De los resultados obtenidos se deduciría que el comportamiento de los ELISAi con respecto al suero Abadín no es uniforme ya que posicionan las diluciones en zonas diferentes del rango de detección de positivos. Un efecto similar se puede observar con el comportamiento con el PSNR-Pos. La dilución 1/32 de este patrón es detectada más próxima al COff en el ELISAi Svanova que en el ELISAi Idexx y la dilución de uso recomendada por el LNR-B para este patrón es detectada como negativa por el ELISAi Idexx (tabla 41).

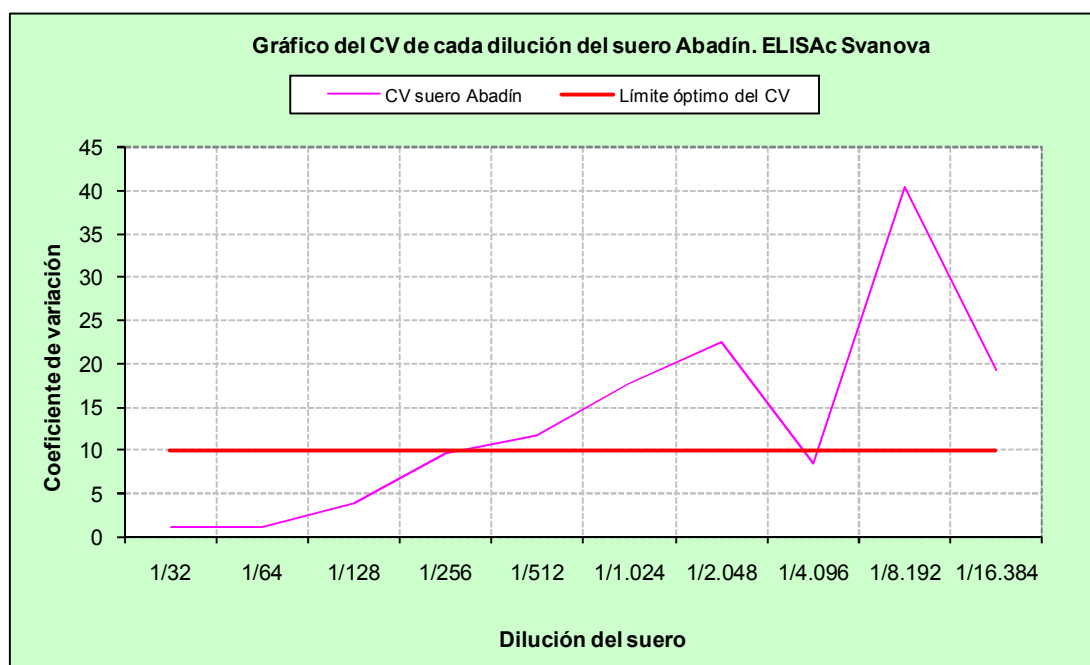
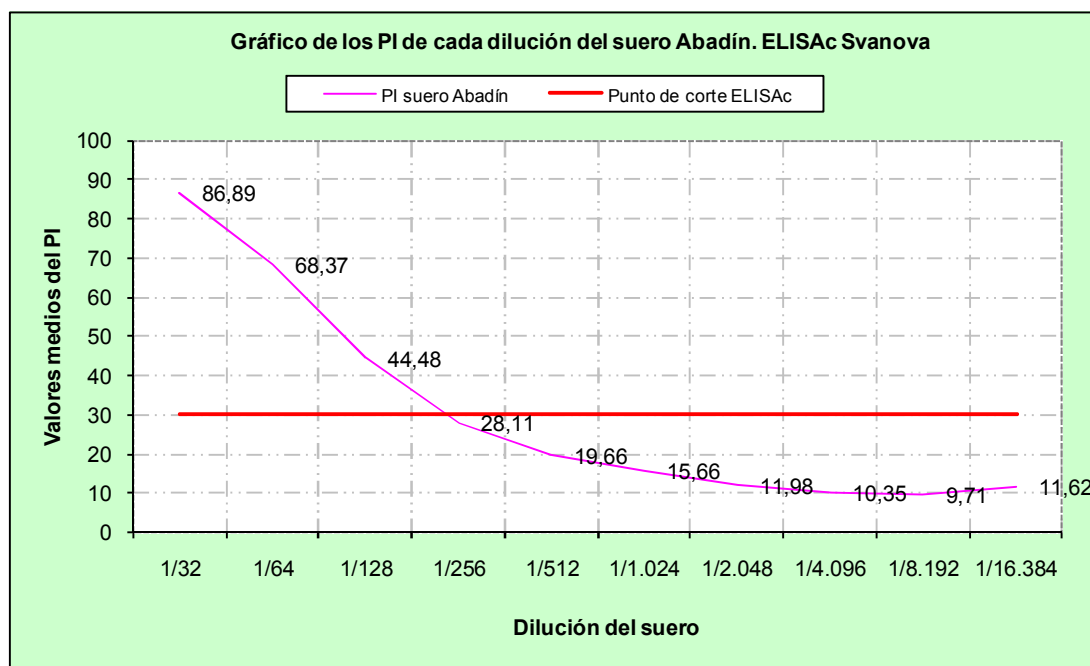
En el ELISAc se seleccionó como primera dilución la 1/100, cuyo valor del PI se estimó por cálculo matemático a partir del de las diluciones 1/128 y 1/64, aunque estrictamente el resultado obtenido se corresponde con el de la dilución 1/98. El PI estimado para esta dilución fue de 56,43, muy próximo al 50% previsto (tabla 41). El PI medio obtenido para el control positivo débil del test en estos ensayos fue de 65,54 (con un CV de 12,36, ligeramente superior al 10% recomendado). La otra dilución en base dos cuyo valor del PI establece un rango junto con el de la 1/100 que contiene a 65,54 es la dilución 1/50, con un PI estimado por cálculo matemático de 77,63. Por tanto, la dilución 1/100 se utilizó como control positivo débil y al 1/50 como control positivo fuerte (tabla 41).



**Figuras 32 y 33. Contienen los valores obtenidos con el ELISAI Svanova para las diluciones correspondientes del suero Abadín. Para cada dilución se representan los valores medios obtenidos del PP y del CV.**

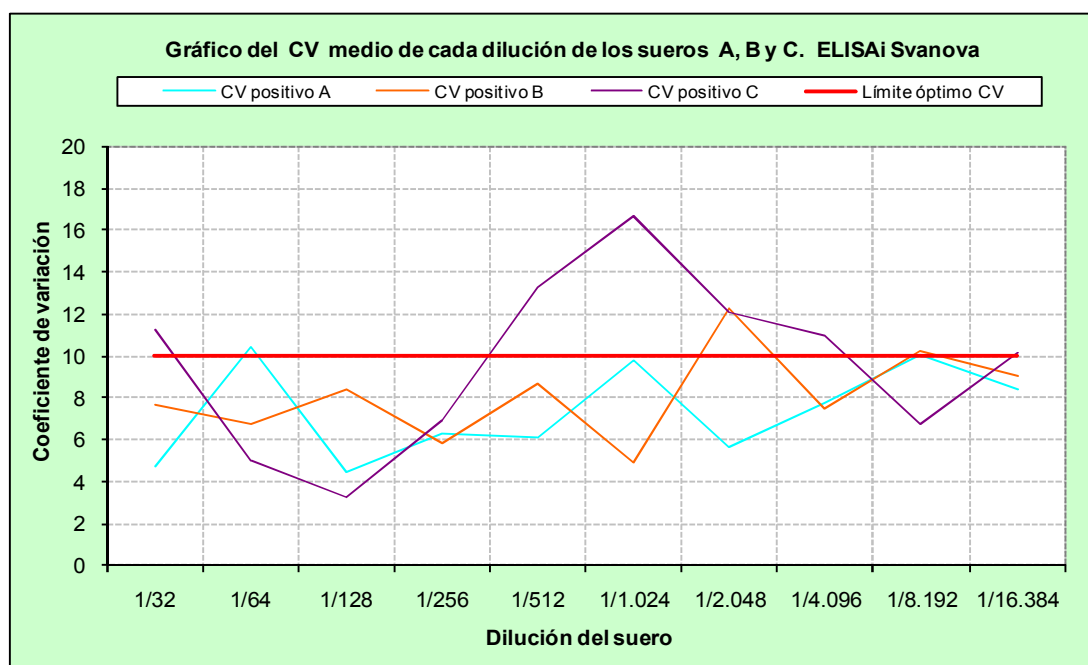
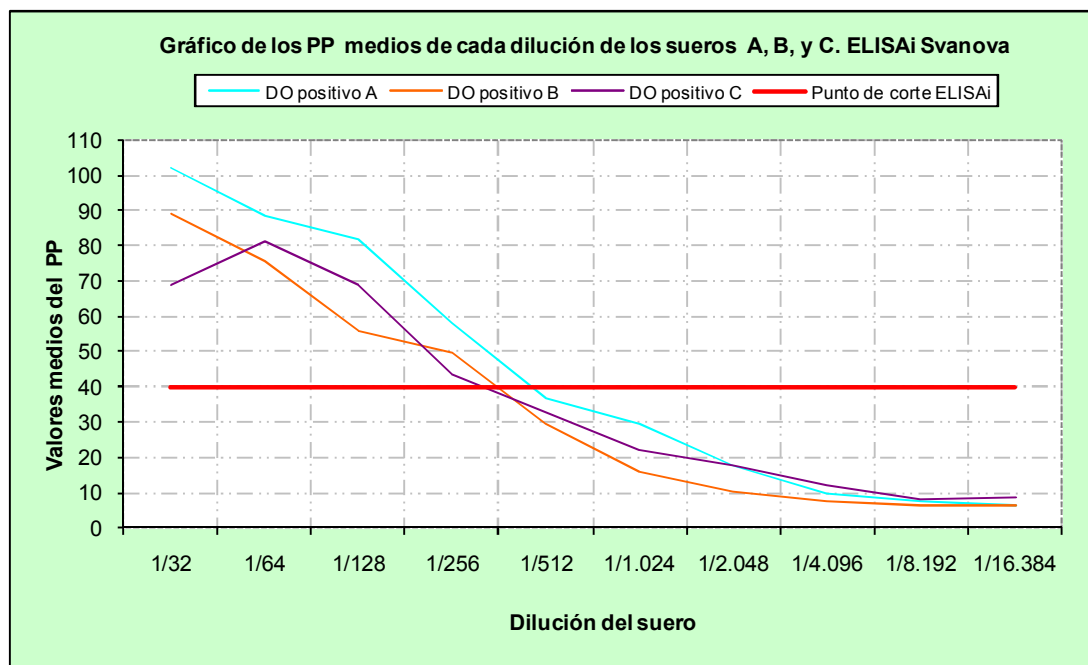


**Figuras 34 y 35. Contienen los valores obtenidos con el ELISAi Idexx para las diluciones correspondientes del suero Abadín. Para cada dilución se representan los valores medios obtenidos del PP y del CV.**



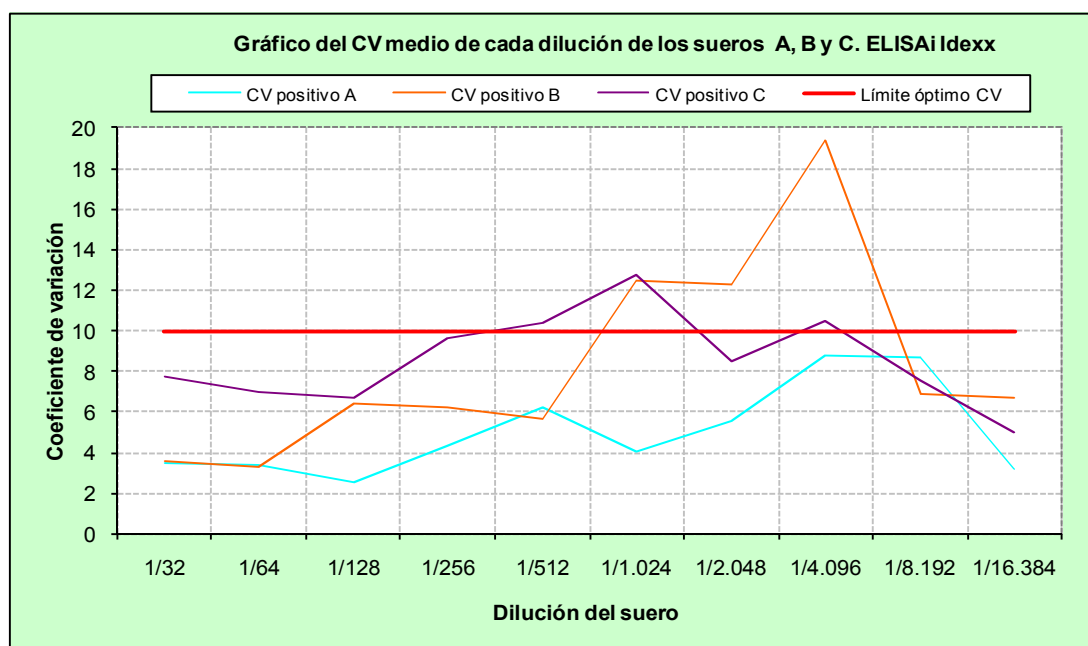
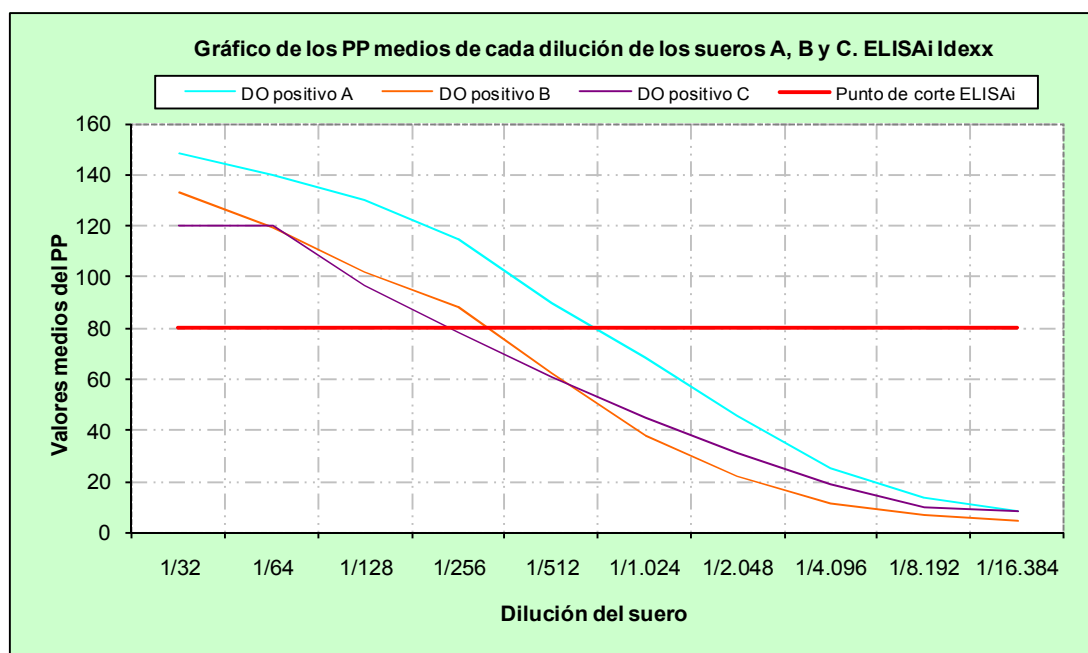
**Figuras 36 y 37. Contienen los valores obtenidos con el ELISAc Svanova para las diluciones correspondientes del suero Abadín. Para cada dilución se representan los valores medios obtenidos del PI y del CV.**

De la figura 38 a la 43 se muestran los resultados obtenidos para las diluciones correspondientes de los sueros A, B y C con los tres ELISAs. Se utilizaron los mismos gráficos que para el suero Abadín.



**Figuras 38 y 39.** Contienen los valores obtenidos con el ELISAI Svanova para las diluciones correspondientes de los sueros A, B y C. Para cada dilución se representan los valores medios obtenidos del PP y del CV.

Cuando se compararon las curvas dosis/respuesta de los tres sueros con la del suero Abadín se observó que sueros con títulos similares a FC se comportaron de forma diferente con los ELISAs, como sucede con el suero positivo A y el suero Abadín, ambos con un título de 1.700 UIFC (figura 32 y 38). Además, la diferencia entre la Se analítica del ELISAc y del ELISAi detectada con el suero Abadín no se manifestó en todos los sueros, como sucede con el suero positivo C, al que todos los ELISAs detectaron como positivo hasta la dilución 1/256 (figuras 38, 40 y 42).

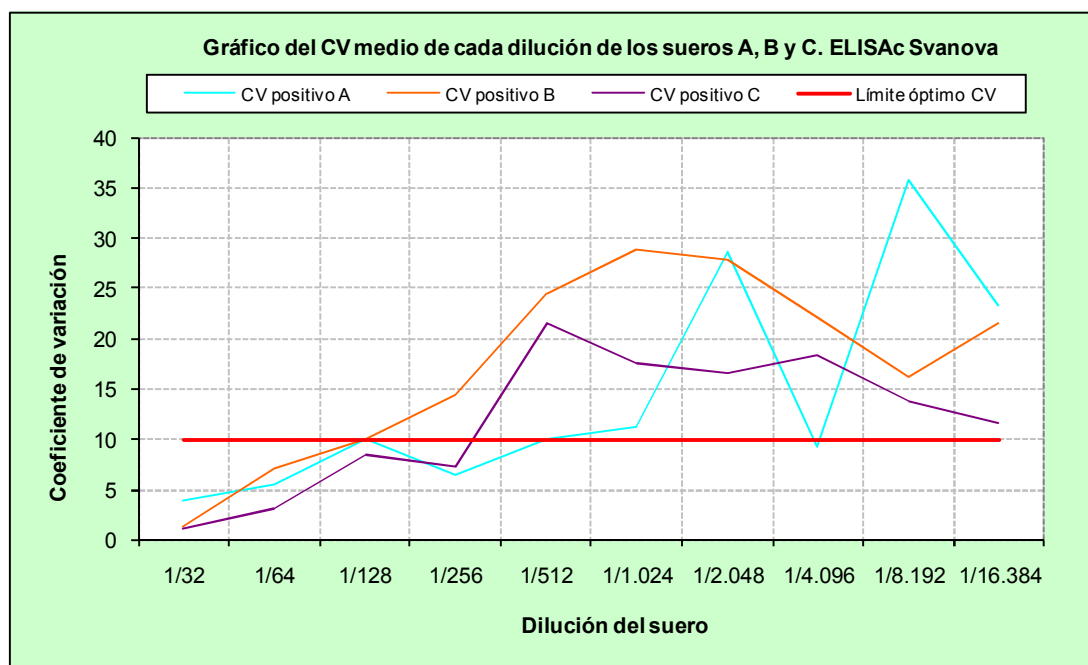
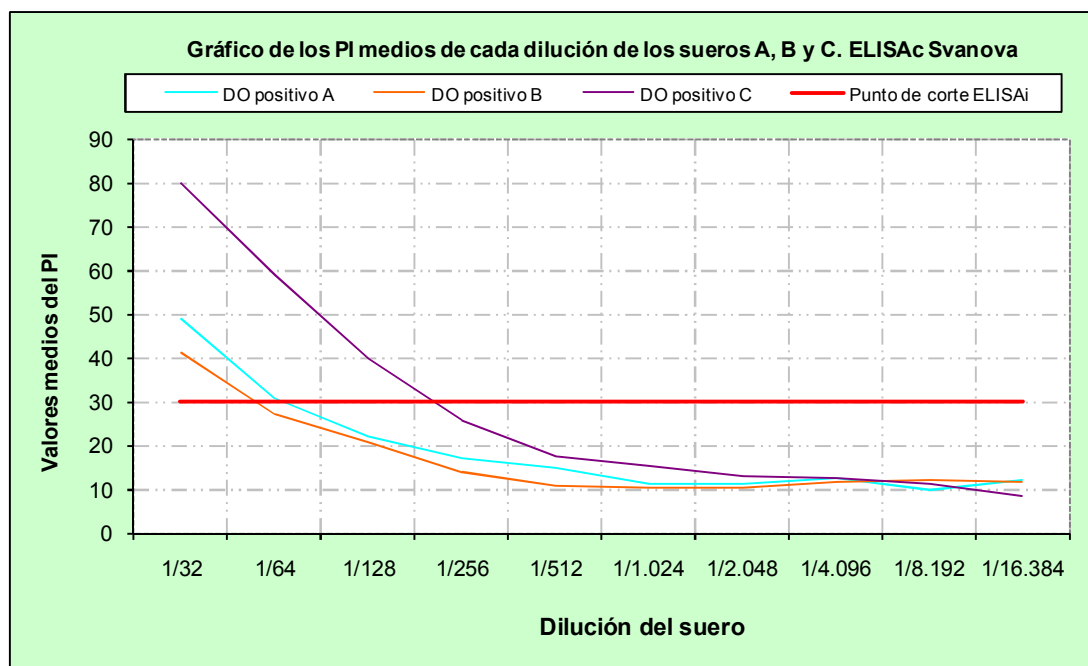


**Figuras 40 y 41.** Contienen los valores obtenidos con el ELISAi Idexx para las diluciones correspondientes de los sueros A, B y C. Para cada dilución se representan los valores medios obtenidos del PP y del CV.



El CV medio obtenido con estos sueros es mayor en el ELISAc que en los ELISAi como sucede con el suero Abadín. Sin embargo, este valor para todas las diluciones con resultado positivo, y en todos los ELISAs, está por debajo de 10% (figuras 39, 41 y 43).

**Los 24 resultados obtenidos con los controles negativos utilizados en los ensayos de verificación de los ELISAs fueron los esperados, es decir, negativos (tabla 35).**



**Figuras 42 y 43. Contienen los valores obtenidos con el ELISAc Svanova para las diluciones correspondientes de los sueros A, B y C. Para cada dilución se representan los valores medios obtenidos del PI y del CV.**

## **2.2. Estimación de la precisión en condiciones de repetibilidad intermedia y elaboración de gráficos de control**

Los gráficos de control se elaboraron con los controles positivos del test y con las dos diluciones de uso del suero Abadín en los ELISAI. Para el ELISAc se utilizaron el control negativo del test, el control del conjugado y las dos diluciones de uso del suero Abadín. En los gráficos se incluyeron los valores obtenidos en las placas que se validaron según las especificaciones de cada test. En la mayoría de los casos, las placas no validadas se eliminaron y fueron nuevamente analizadas, excepto alguna correspondiente a muestras calificadas como negativas.

Los valores obtenidos con los controles se representaron en gráficos tipo DDD (figuras 44 a 49) y en gráficos tipo SDC (figuras 50 a 55). Para los controles del test se representó la DO y para las dos diluciones del suero Abadín el PP y el PI, según el test.

Con respecto a los gráficos DDD de la DO de los controles positivos y negativo de los test se observó que sólo en una placa del ELISAI Idexx y en otra del ELISAc Svanova una de las barras de error sobrepasó la línea de aviso del 20%, mientras que los valores medios de las placas se mantuvieron dentro de los límites establecidos por el fabricante para los lotes utilizados en los ensayos. Sin embargo, para el ELISAI Svanova se observó que el número de placas con alguna barra de error que excedía el 20% fue de cinco. Precisamente, con respecto a estas barras, el ELISAI Idexx es el que presentó los valores menos dispersos. Sin embargo, el CV de la DO de todos los controles, independientemente del test, fue inferior al 10%: 7,81 en el ELISAI Svanova, 4,95 en el ELISAI Idexx y 5,69 en el ELISAc Svanova.

El CV de la DO de las dos diluciones del suero Abadín, la 1/1600 y la 1/400, en el ELISAI Svanova, superó el 10% en ambas (11,49 y 13,88 respectivamente). En el ELISAI Idexx, el CV no superó el 10% en ninguna (5,76 en ambas). En el ELISAc Svanova, las dos diluciones, la 1/100 y la 1/50, superaron el 10% (11,77 y 18,32, respectivamente). Estos valores se obtuvieron con una única muestra por placa, por lo que para mejorar la dispersión de los valores, en los gráficos se incluyó el PP, o el PI según el test. Para estos valores, los CV fueron los siguientes: 7,95 y 10,30 para el ELISAI Svanova, ELISAI Idexx 4,56 y 4,57 y 9,83 y 4,91 para el ELISAc Svanova. En los gráficos DDD con el suero Abadín, en el ELISAc Svanova y en el ELISAI Idexx algunas líneas de referencia aparecieron superpuestas, lo que guardaría relación con la amplitud del rango de detección de positivos entre las dos diluciones de este suero.

Los resultados del suero Abadín, en los tres test, indicaron que fueron capaces de diferenciar claramente distintos niveles de Ac para la misma muestra en todas las placas analizadas (figuras 45, 47 y 49). De estas diluciones, la que tenía un mayor significado era la más próxima al COff y para todas las muestras de esta dilución el resultado obtenido fue positivo en todas las placas analizadas. Los resultados obtenidos con las dos diluciones de este suero se encontraron dentro del rango esperado de valores, excepto en una placa del ELISAI Svanova, que sobrepasó el límite superior esperado, y en dos placas del ELISAc Svanova, que sobrepasaron el límite inferior esperado. Sin embargo, a pesar de distribuirse próximos al valor

medio esperado, se observa alguna desviación. La dilución débil del suero Abadín en el ELISAI Svanova apareció desviada por encima de la media, al contrario de lo que sucedió en el ELISAc Svanova en el que apareció por debajo de la media. La dilución fuerte del suero Abadín apareció desviada por encima de la línea media de referencia en el ELISAI Idexx.

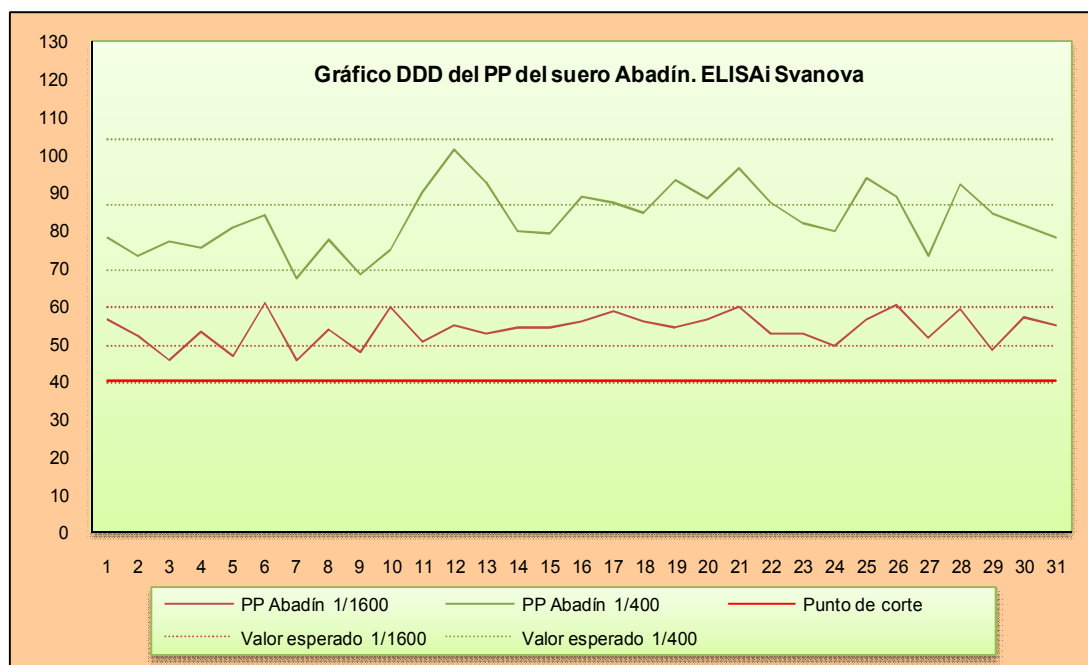
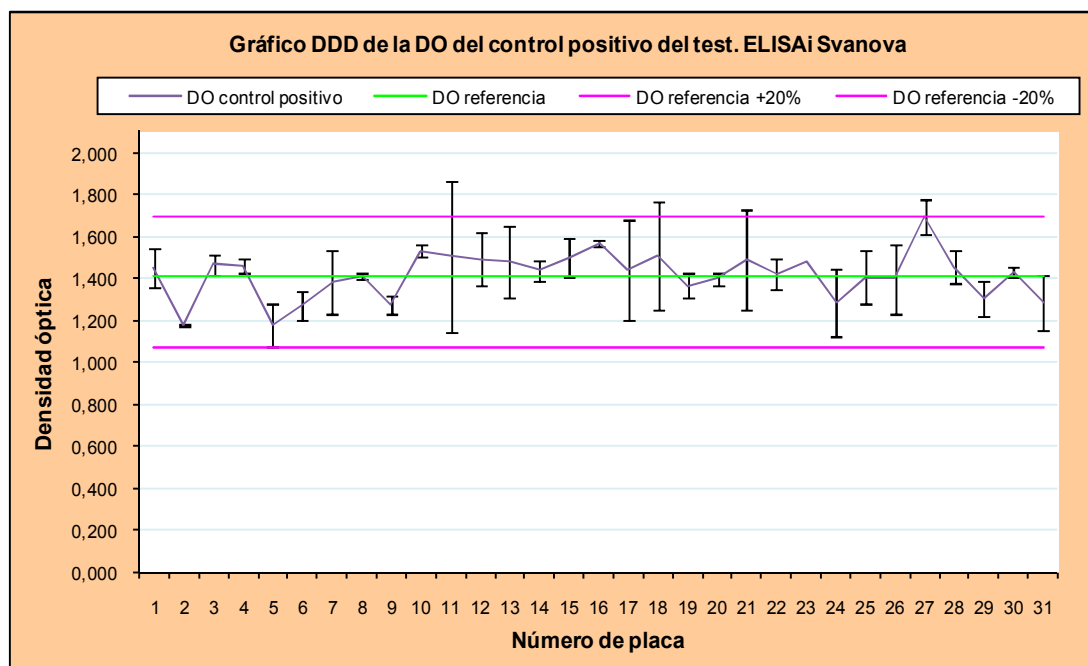
En el ELISAI Svanova se presentaron dos resultados peculiares. En la figura 44 se apreció una barra de error muy grande en el placa 11 correspondiente a la DO del control positivo del test. Esto fue debido a que uno de los valores de este con tuvo un valor más bajo del esperado, pero el valor medio de la DO se mantuvo próximo al valor esperado. Sin embargo, en la figura 45 se observó un pico muy marcado del PP del suero Abadín en la placa 12 como consecuencia de un valor muy elevado de su DO, siendo el valor de la DO del control positivo del test el esperado.

Los gráficos SDC se obtuvieron en 7 días de ensayos para los ELISAI y en 12 días para el ELISAc como se apreció desde la figura 50 a la 55. En los ELISAI el ajuste del suero Abadín con el control positivo del test fue adecuado tanto para la DO como para el PP. Estos valores aparecieron superpuestos en los dos ELISAI (figura 50 a 53), el fuerte en el ELISAI Svanova y el débil en el ELISAI Idexx. Especialmente adecuados fueron los resultados en este último, con unas barras de error muy pequeñas, indicativas de una dispersión baja de los valores en cada día de ensayo. En ELISAI Svanova se apreció una dispersión importante de los valores de la DO que afectaron tanto a la de la dilución 1/400 del suero Abadín como a la del control positivo del test (figura 50). Sin embargo, para este mismo test, los resultados obtenidos con los datos normalizados fueron mucho más estables (figura 51).

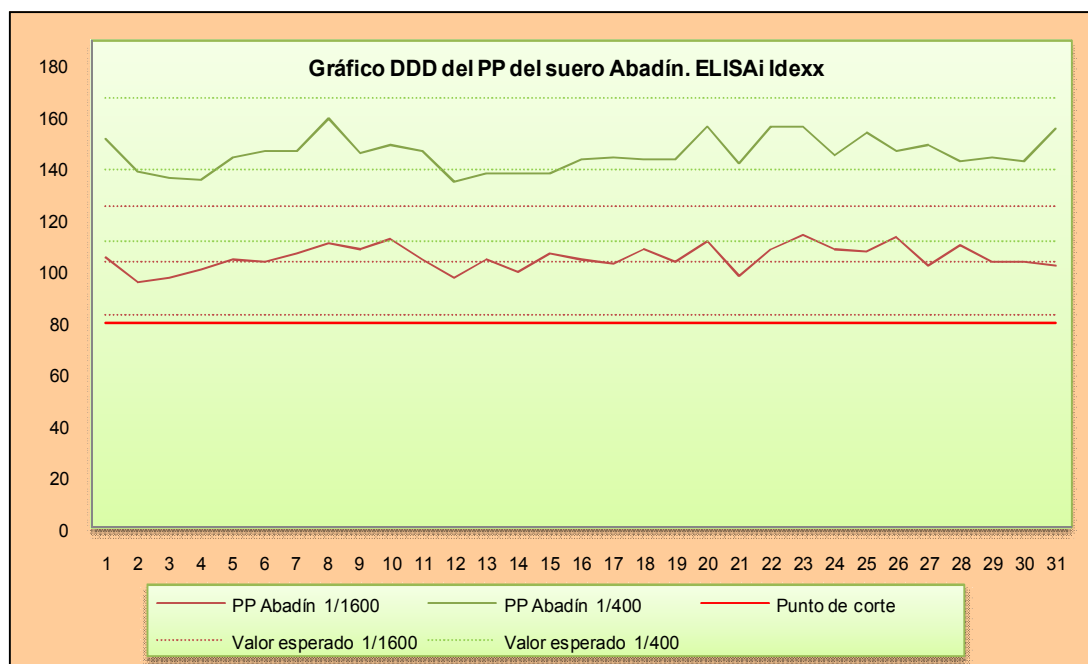
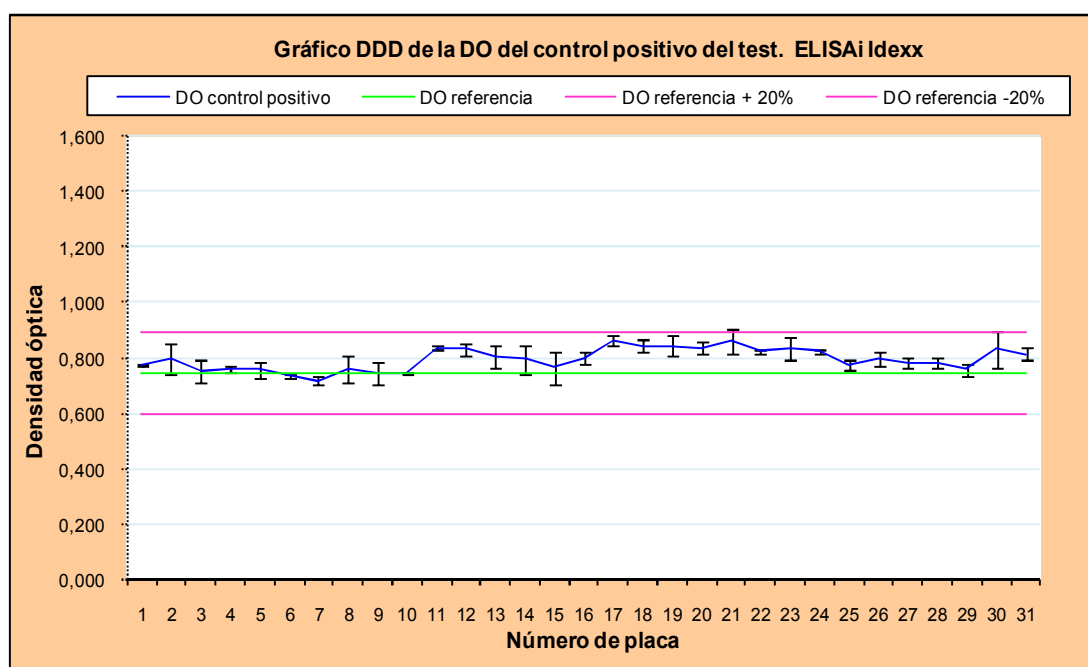
Para el ELISAc se observó que las diluciones del suero Abadín estuvieron alejadas de los valores obtenidos con el control del conjugado. Sin embargo, el PI de la dilución alta fue bastante próximo al COff 40 del test. Las dos diluciones del suero aparecieron perfectamente diferenciadas en todos los días de ensayo. De todas formas, tal como se apreció en la figura 36, una dilución de 1/128 podría ser adecuada para usar con este test. Las barras de error de la DO y del PI fueron cortas, lo que indicó una dispersión pequeña de los valores, a excepción del día cuatro de ensayos en el que la dispersión de la DO y del PI de la dilución 1/100 del suero Abadín fue muy elevada.

Para todos los test se observó, en la práctica totalidad de los días de ensayo, que las elevaciones o descensos de los valores medios del día afectaron de forma similar a ambas diluciones del suero Abadín.

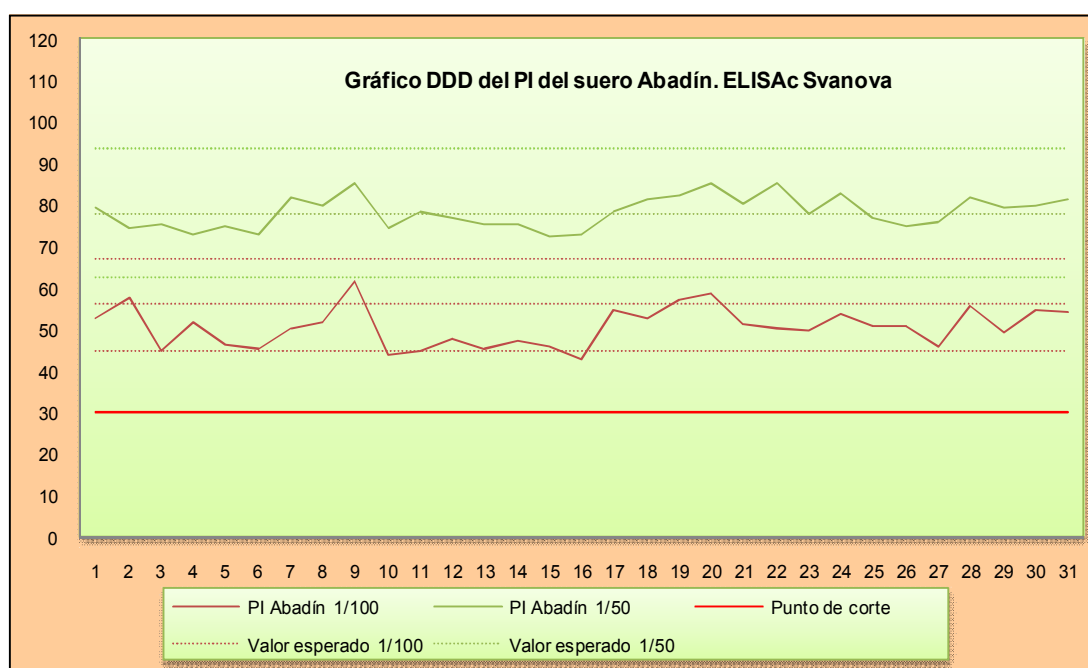
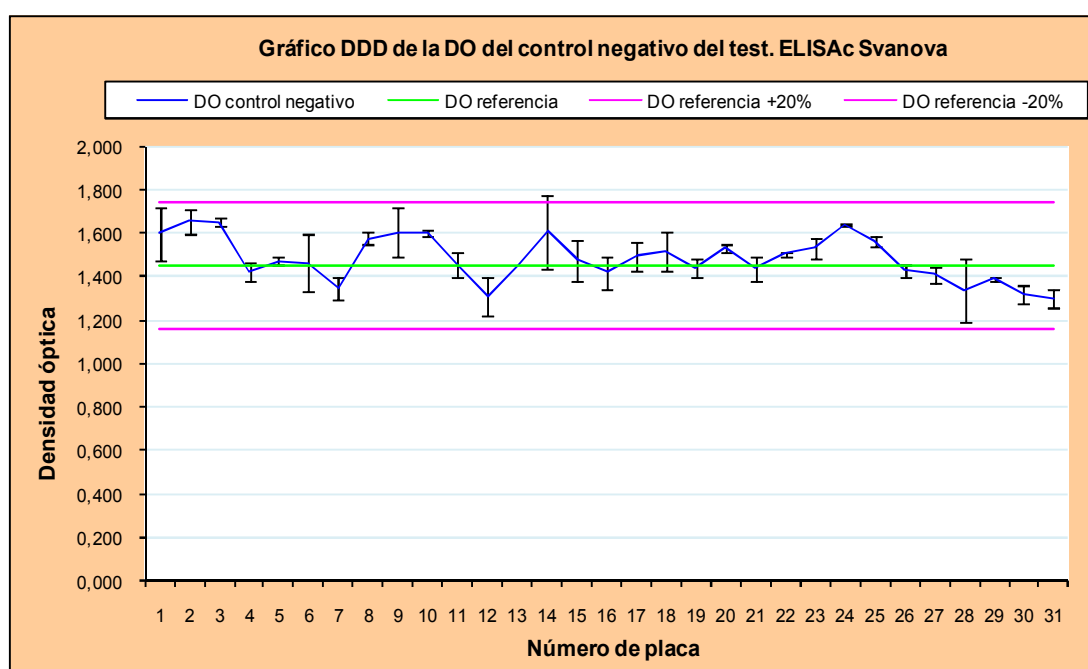
En el conjunto de los gráficos se observó un mejor comportamiento del ELISAI Idexx que en el ELISAI Svanova y en el ELISAc Svanova. En los gráficos DDD del control positivo del test el comportamiento fue mejor para el ELISAI Idexx que para el ELISAI Svanova. El CV de la DO de las diluciones del suero Abadín también fueron mejor para el ELISAI Idexx que para los otros dos ELISAs de Svanova. En los gráficos SDC también fue mejor el comportamiento del ELISAI Idexx que el de los ELISA de Svanova. Para estos últimos, las variaciones fueron más importantes para la DO de las diluciones del suero Abadín en el ELISAI Svanova y para la DO del control negativo en el ELISAc Svanova.



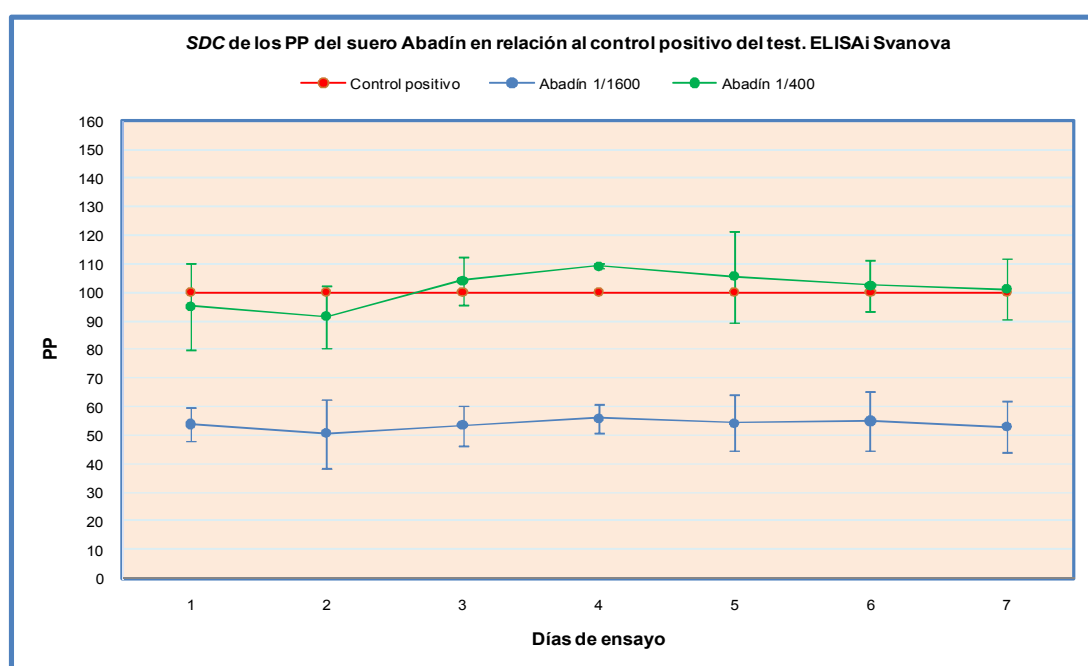
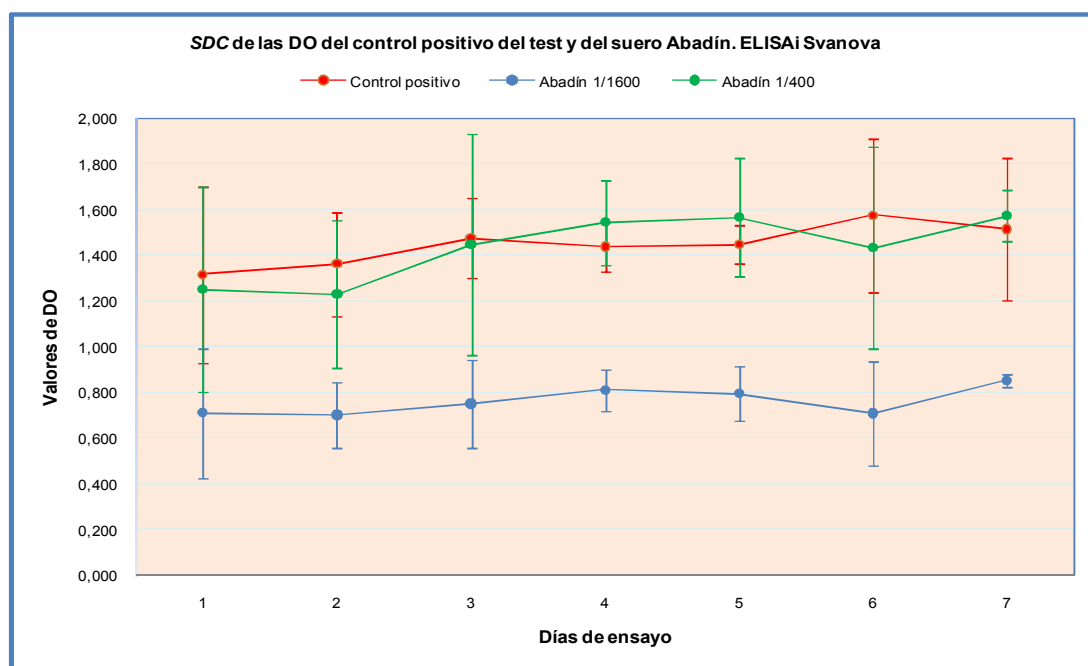
**Figuras 44 y 45. Gráficos tipo DDD del ELISAI Svanova en los que el primero contiene los valores de la DO del control positivo del test y el segundo, los valores del PP de las dos diluciones del suero Abadín (1/1600 y 1/400), obtenidos en relación al control positivo del test. Se representan los valores correspondientes a cada placa analizada.**



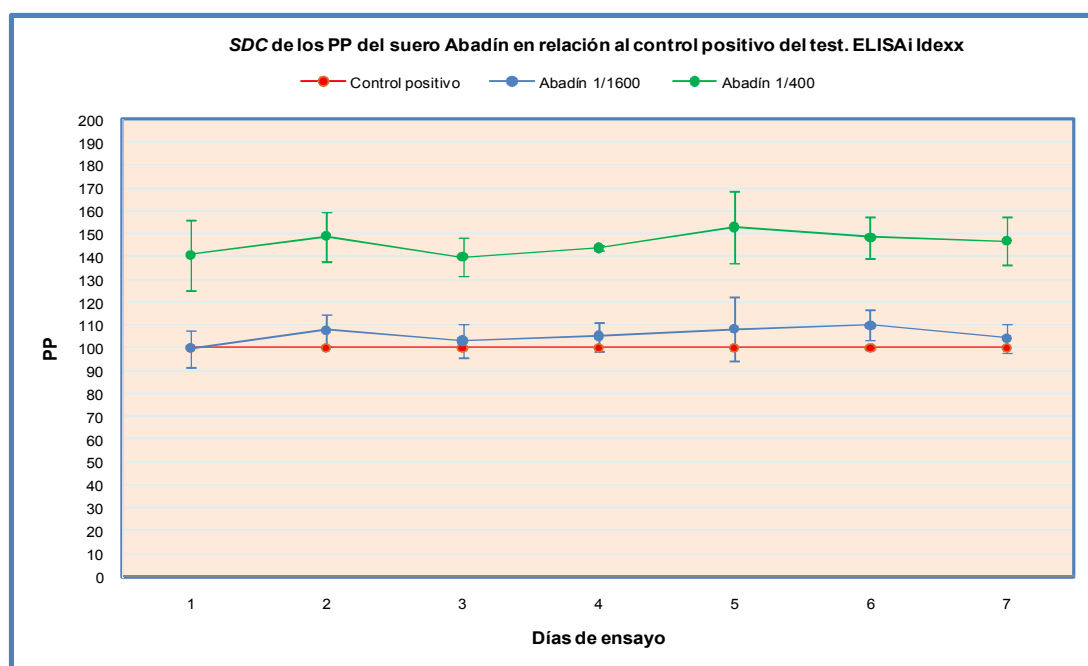
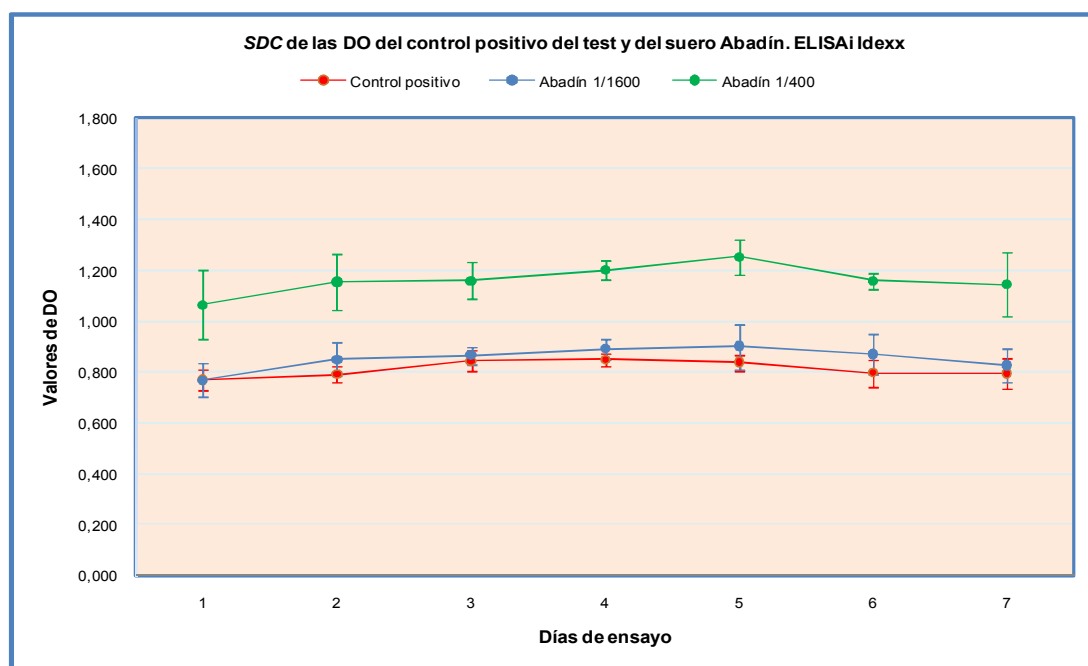
**Figuras 46 y 47. Gráficos tipo DDD del ELISAI Idexx en los que el primero contiene los valores de la DO del control positivo del test y el segundo, los valores del PP de las dos diluciones del suero Abadín (1/1600 y 1/400), obtenidos en relación al control positivo del test. Se representan los valores correspondientes a cada placa analizada.**



**Figuras 48 y 49. Gráficos tipo DDD del ELISAc Svanova en los que el primero contiene los valores de la DO del control negativo del test y el segundo, los valores del PI de las dos diluciones del suero Abadín (1/1600 y 1/400), obtenidos en relación al control del conjugado del test. Se representan los valores correspondientes a cada placa analizada.**

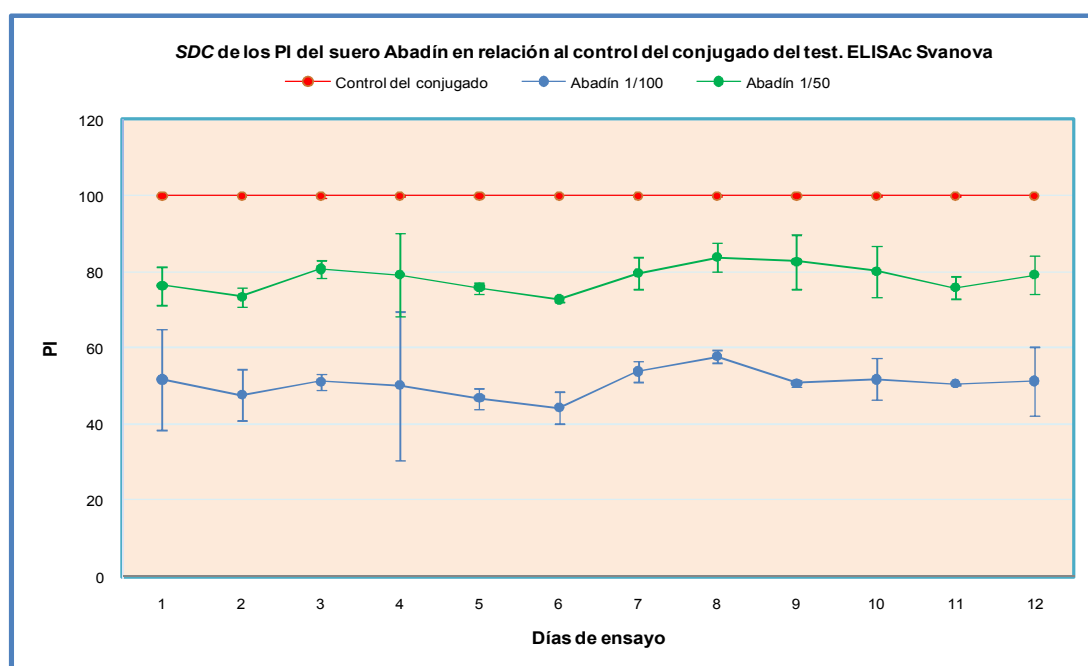
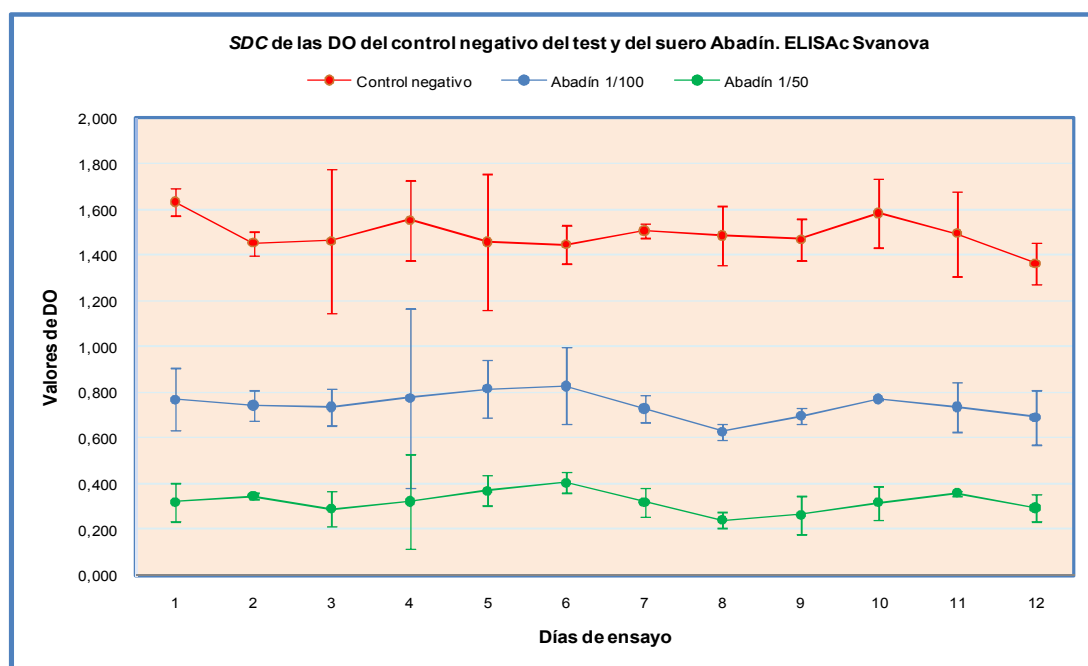


**Figuras 50 y 51. Gráficos tipo SDC del ELISAI Svanova en los que el primero contiene los valores de DO del control utilizado para la obtención del PP de las muestras y de las dos diluciones del suero Abadín y el segundo, los valores del PP de las dos diluciones del suero Abadín en relación al control positivo del test. Se representan los valores medios obtenidos entre todas las placas analizadas en el mismo día.**



**Figuras 52 y 53. Gráficos tipo SDC del ELISAI Idexx en los que el primero contiene los valores de DO del control utilizado para la obtención del PP de las muestras y de las dos diluciones del suero Abadín y el segundo, los valores del PP de las dos diluciones del suero Abadín en relación al control positivo del test. Se representan los valores medios obtenidos entre todas las placas analizadas en el mismo día.**





**Figuras 54 y 55. Gráficos tipo SDC del ELISAc Svanova en los que el primero contiene los valores de DO del control negativo del test y de las dos diluciones del suero Abadín y el segundo, los valores del PI de las dos diluciones del suero Abadín en relación al control del conjugado del test. Se representan los valores medios obtenidos entre todas las placas analizadas en el mismo día.**

### 3. Extensión de la validación para los test de ELISA

#### 3.1. Estimación del tamaño de muestra necesario para la extensión de la validación

Aplicando las recomendaciones de Jacobson (1998), los tamaños de muestra obtenidos por EPIDAT para la validación de pruebas diagnósticas serían los siguientes:

Tamaños de muestra y precisión para pruebas diagnósticas			
○ Se:	92,000%		
○ Sp:	90,000%		
○ Razón no enfermos/enfermos:	1,000		
○ Nivel de confianza:	95,0%		
Precisión (%)	Enfermos	Sanos	Total
2,00	866	865	1731

Tabla 42.- N° de muestras usadas y valores estimados de Se y la Sp en diferentes estudios

Bibliografía	Identificación del tet	Muestras utilizadas en los ensayos		ELISAI		ELISAc	
		Positivas	Negativas	Sn%	Sp%	Sn%	Sp%
Dohoo y cols., 1986	S-LPS	174	1.208	96,6	98,4		
Gall y cols, 1998 (*)	ADRI	1.857	2.613	96,77	93,57		
Gall y cols, 1998 (*)	S-LPS	1.857	2.613			97,47	98,32
McGiven y cols., 2003	S-LPS	146	6.957	97,2	97,8		
McGiven y cols., 2003	O-polysac	146	1.440			95,2	99,7
Moreno y cols., 1998	ELISA102	665	1.018	100	95,65		
Moreno y cols., 1998	ELISA-1	665	1.018			95,39	94,36
Nielsen y cols., 1995	M84	1.446	636			100	99,7
Nielsen y cols., 1996	EDTA/EGTA	636	763	100	99,4		
Nielsen y cols., 1996 (**)	O-polysac	636	1.446			98,6	97,7
Nielsen y cols., 2008	Nuevo ELISAc	410	2.014			99,5	100
Portanti y cols., 2006	S-LPS	265	748			100	100
Uzal y cols., 1996	S-LPS	184	243	98,7	98,9		

(\*) Estudio realizado en 4 países Sudamericanos. El número de muestras es el total de los cuatro estudios y el valor de la Sn y la Sp es el promedio de todos ellos.  
 (\*\*) Resultados de los primeros ensayos. Los resultados considerados aberrantes fueron investigados una segunda vez.

El número de muestras utilizado para la estimación de parámetros de rendimiento de test de ELISA para el diagnóstico de la brucelosis bovina es variable según los estudios realizados. Sin embargo, se puede apreciar que en todos ellos el número de muestras negativas casi siempre es inferior al de muestras positivas (tabla 42). En este estudio, con respecto a los datos de la tabla 42, el número de muestras positivas está por debajo de la media del grupo (699) y de la mediana (636). Sin embargo, el número de muestras negativas está por encima de la media (1.747) y de la mediana (1.208) del grupo de la tabla 42.

El número de muestras utilizadas consideradas como positivas y negativas verdaderas para la estimación del rendimiento de test en este estudio permiten obtener los siguientes valores:

<b>Método de referencia:</b>			
○ Se:	95,000%		
○ Sp:	95,000%		
○ Razón no enfermos/enfermos:	10,000		
○ Nivel de confianza:	95,0%		
Precisión (%)	Enfermos	Sanos	Total
-----	-----	-----	-----
3,000	203	2030	2.233

<b>Método relativo de comparación:</b>			
○ Se:	92,000%		
○ Sp:	95,000%		
○ Razón no enfermos/enfermos:	7,000		
○ Nivel de confianza:	95,0%		
Precisión (%)	Enfermos	Sanos	Total
-----	-----	-----	-----
3,000	315	2.205	2.520

En resumen, con este banco de muestras los parámetros de rendimiento de los test permiten una precisión del 3% para un intervalo de confianza del 95%.

## 3.2. Comparación con otros métodos de ensayo

### 3.2.1. Criterio de comparación absoluto

#### 3.2.1.1. Parámetros básicos de rendimiento

Los COff utilizados son los recomendados por el fabricante en los test de ELISA y los establecidos por la legislación vigente en los test de la AMRB y de la FC.

En la tabla 43 se especifican los valores de los parámetros básicos de rendimiento obtenidos para los diferentes test utilizados en este estudio con respecto al método de referencia. En términos generales, el comportamiento de todos los test fue aceptable, pero existieron diferencias significativas entre alguno de ellos y para alguno de los parámetros estimados. Con respecto a la Se no se apreciaron diferencias significativas entre los test. Sin embargo, los valores obtenidos no fueron tan elevados como los obtenidos para la Sp, especialmente en el caso del ELISAi Idexx (89,6%), aunque la diferencia no fuese significativa con respecto a la obtenida para los otros test. Todos los test presentaron una excelente Sp y superior al 99%. Sin embargo, existieron diferencias significativas en algún caso. La Sp más elevada correspondió a la AMRB y a la FC utilizados en serie (AMRB+FC). El ELISAc Svanova y la AMRB presentaron una Sp significativamente menor que la AMRB+FC. Además, el ELISAc Svanova presentó una Sp significativamente menor que los dos ELISAi. Con respecto a la Sp de los ELISAi cabe destacar que el ELISAi Idexx presentó una Sp casi del 100%.

Tabla 43. Valores de los parámetros de rendimiento de los ELISAs aplicando el criterio de comparación absoluto

	<b>AMRB</b>	<b>AMRB + FC (en serie)</b>	<b>ELISAi Svanova</b>	<b>ELISAi Idexx</b>	<b>ELISAc Svanova</b>
<b>Se (%)</b>	<b>95,26</b> (92,31-98,21)	<b>93,10</b> (89,63-96,58)	<b>94,40</b> (91,22-97,57)	<b>89,66</b> (85,62-93,73)	<b>94,74</b> (91,62-97,85)
<b>Sp (%)</b>	<b>99,67</b> (99,40-99,94)	<b>100,00</b> (99,98-100,00)	<b>99,86</b> (99,67-100,00)	<b>99,90</b> (99,75-100,00)	<b>99,13</b> (98,70-99,55)
<b>Índice de validez (%)</b>	<b>99,23</b> (98,85-99,61)	<b>99,32</b> (98,96-99,67)	<b>99,31</b> (98,96-99,67)	<b>98,87</b> (98,42-99,32)	<b>98,69</b> (98,20-99,18)
<b>Valor predictivo + (%)</b>	<b>96,93</b> (94,47-99,39)	<b>100,00</b> (99,77-100,00)	<b>98,65</b> (96,90-100,00)	<b>99,05</b> (97,50-100,00)	<b>92,31</b> (88,68-95,94)
<b>Valor predictivo - (%)</b>	<b>99,48</b> (99,15-99,81)	<b>99,25</b> (98,85-99,64)	<b>99,38</b> (99,03-99,74)	<b>98,85</b> (98,37-99,33)	<b>99,42</b> (99,06-99,77)
<b>Índice de Youden</b>	<b>0,95</b> (0,92-0,98)	<b>0,93</b> (0,90-0,96)	<b>0,94</b> (0,91-0,97)	<b>0,90</b> (0,86-0,93)	<b>0,94</b> (0,91-0,97)
<b>Razón de verosimilitud +</b>	<b>286,73</b> (136,79-601,04)	-	<b>661,41</b> (213,40-2049,97)	<b>927,93</b> (232,07-3710,35)	<b>108,37</b> (68,35-171,83)
<b>Razón de verosimilitud -</b>	<b>0,05</b> (0,03-0,08)	<b>0,07</b> (0,04-0,11)	<b>0,06</b> (0,03-0,10)	<b>0,10</b> (0,07-0,15)	<b>0,05</b> (0,03-0,09)
<b>Prevalencia real (%)</b>	<b>9,92</b> (8,69-11,15)	<b>9,92</b> (0,90-0,96)	<b>9,94</b> (8,70-11,18)	<b>10,08</b> (8,83-11,33)	<b>9,97</b> (8,72-11,22)
<b>Índice de rendimiento (Se + Sp)</b>	<b>194,93</b> (191,71-198,15)	<b>193,10</b> (189,61-196,58)	<b>194,26</b> (190,87-197,57)	<b>189,56</b> (185,37-193,73)	<b>193,87</b> (190,32-197,40)

(Los valores entre paréntesis corresponden a los obtenidos para un intervalo de confianza del 95%)

En relación a la eficiencia o índice de validez no se apreciaron diferencias significativas entre los test y para todos ellos el valor obtenido fue superior al 98,69% (que fue el valor más bajo de todos y correspondió al ELISAc Svanova).

Todos los test presentaron un excelente VPN, sobre todo teniendo en cuenta que la prevalencia de la enfermedad en la población seleccionada fue de un 10% y a medida que desciende la prevalencia aumenta el VPN. No se apreciaron diferencias significativas para este parámetro entre los test estudiados. No sucedió lo mismo para el VPP en el que si se apreciaron diferencias significativas. Al igual que para la Se, la AMRB y el ELISAc Svanova presentó un VPP significativamente menor que la AMRB+FC y, además, el ELISAc Svanova presentó un VPP significativamente menor que los dos ELISAi.

El Índice de Youden tuvo un valor elevado en todos los test con valores próximos a 1 y no se observaron diferencias significativas entre los test.

En relación a la RV+ se pudo observar que el valor obtenido fue muy superior a 10 para todos los test y por tanto, la contribución de un resultado positivo de la prueba a la presencia de la enfermedad en el animal fue amplia (tabla 14). Sin embargo, esta contribución fue significativamente menor en el ELISAc Svanova en relación a los test de ELISA y a la AMRB. La RV+ para la AMRB+FC no se pudo estimar ya que el valor de los falsos positivos con estos test, en este estudio, fue cero.

En relación a los valores de la RV- no se apreciaron diferencias significativas entre los test. La información suministrada por todos ellos test fue amplia si bien para el ELISAi Idexx se encontraba en el límite entre amplia y moderada. Cuando se estimó el valor de la RV- según la recomendación de Delgado y Llorca (2002) el valor de la RV- sería de 9,66 y según la tabla 14 aportaría una información moderada a diferencia de los otros test en los que sería amplia.

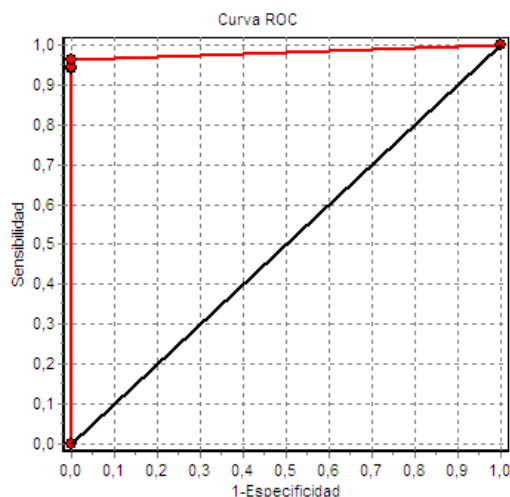
El descenso de la Se de la AMRB en relación a la AMRB+FC fue debido a que cinco muestras positivas a AMRB fueron negativas a la FC, pero cuatro de ellas presentaron un valor de 15 UIFC, es decir, situado en el límite de positividad de la prueba (tabla 32).

Los valores del índice de rendimiento (RI) propuesto por Gall y Nielsen (2004), como suma de la Se y Sp de cada test, serían de 194,93 para el AMRB; de 193,10 para la AMRB+FC; de 194,26 para el ELISAi Svanova; de 189,56 para el ELISAi Idexx y de 193,87 para el ELISAc Svanova.

### 3.2.1.2. Curvas ROC

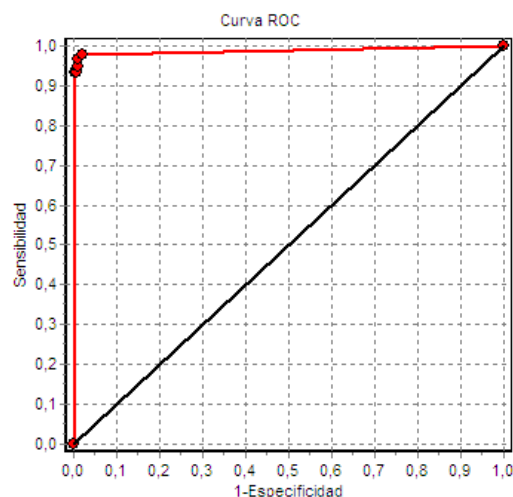
Figura 56. Curvas ROC de los tres ELISAs aplicando el criterio de comparación absoluto

#### ELISAI Svanova



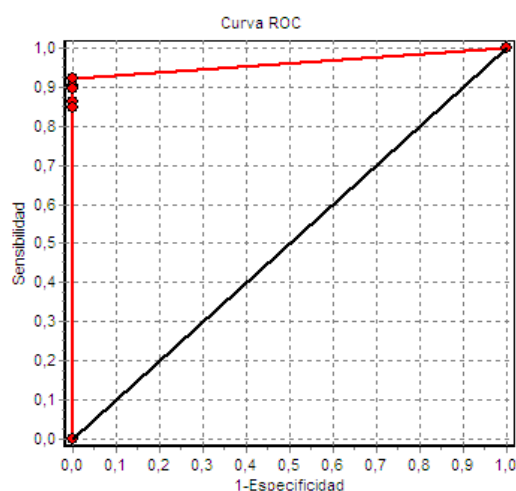
Área ROC	EE	IC(95%)		
0,9801	0,0064	0,9676	0,9926	Delong
	0,0065	0,9674	0,9928	Hanley & McNeil

#### ELISAc Svanova



Área ROC	EE	IC(95%)		
0,9856	0,0050	0,9758	0,9955	Delong
	0,0056	0,9747	0,9965	Hanley & McNeil

#### ELISAI Idexx



Área ROC	EE	IC(95%)		
0,9609	0,0088	0,9436	0,9782	Delong
	0,0090	0,9433	0,9784	Hanley & McNeil

En todos los casos, para la obtención de estas curvas, se utilizaron 5 tablas de 2x2, con un nivel de confianza del 95%, para la obtención de 5 valores que incluían el valor del COff del el test y dos valores por encima y dos por debajo de éste, a la misma distancia. El test que presentó la AUC mayor fue el ELISAc Svanova (0,9856), a continuación estuvo el ELISAI Svanova (0,9801) y, por último el ELISAI Idexx (0,9609). No se observaron diferencias significativas entre ninguno de ellos (figura 56).

Con respecto al COff, en el ELISAc Svanova los mejores resultados se obtuvieron para un PI de 20 (el recomendado por el fabricante fue del 30). En el ELISAI Svanova el mejor resultado se obtiene para un PI de 30 (el recomendado por el fabricante fue de 40). Sin embargo, para ambos test, las modificaciones del COff afectarían poco a las respectivas exactitudes. Para el ELISAI Idexx, el COff más adecuado estaría en 70 y, probablemente, se mejoraría su comportamiento con valores menores a éste. Además, en este caso, el descenso del PP si mejoraría la exactitud del test (AUC del COff a 70 fue de 0,9607 y a 80 fue de 0,9521) (figura 56).

### 3.2.1.3. Índice Kappa

Tabla 44. Obtención del índice Kappa para los diferentes test aplicando el criterio de comparación absoluto

Intervalo de confianza: 95 %				
Test estándar	Aislamiento			
Test alternativo	AMRB			
Test alternativo	Test estándar			
	A	B	C	Total
	a	221	7	228
	b	11	2.100	2.111
	c			
Intervalos de confianza				
Kappa	Lim. Inf.	Lim. Sup.		Se(0)
	0,916	0,997	0,021	Se(0)
0,957				
Kappa	Lim. Inf.	Lim. Sup.		Se(1)
	0,937	0,977	0,010	Se(1)

Intervalo de confianza: 95 %				
Test estándar	Aislamiento			
Test alternativo	AMRB + FC			
Test alternativo	Test estándar			
	A	B	C	Total
	a	216	0	216
	b	16	2.107	2.123
	c			
Intervalos de confianza				
Kappa	Lim. Inf.	Lim. Sup.		Se(0)
	0,920	1,001	0,021	Se(0)
0,961				
Kappa	Lim. Inf.	Lim. Sup.		Se(1)
	0,941	0,980	0,010	Se(1)

Intervalo de confianza: 95 %				
Test estándar	Aislamiento			
Test alternativo	ELISAI Svanova			
Test alternativo	Test estándar			
	A	B	C	Total
	a	219	3	222
	b	13	2.099	2.112
	c			
Intervalos de confianza				
Kappa	Lim. Inf.	Lim. Sup.		Se(0)
	0,920	1,002	0,021	Se(0)
0,961				
Kappa	Lim. Inf.	Lim. Sup.		Se(1)
	0,942	0,980	0,010	Se(1)

Intervalo de confianza: 95 %				
Test estándar	Aislamiento			
Test alternativo	ELISAI Idexx			
Test alternativo	Test estándar			
	A	B	C	Total
	a	208	2	210
	b	24	2.068	2.092
	c			
Intervalos de confianza				
Kappa	Lim. Inf.	Lim. Sup.		Se(0)
	0,894	0,976	0,021	Se(0)
0,935				
Kappa	Lim. Inf.	Lim. Sup.		Se(1)
	0,910	0,960	0,013	Se(1)

Intervalo de confianza: 95 %				
Test estándar	Aislamiento			
Test alternativo	ELISAc Svanova			
Test alternativo	Test estándar			
	A	B	C	Total
	a	216	18	234
	b	12	2.041	2.053
	c			
Intervalos de confianza				
Kappa	Lim. Inf.	Lim. Sup.		Se(0)
	0,887	0,969	0,021	Se(0)
0,928				
Kappa	Lim. Inf.	Lim. Sup.		Se(1)
	0,902	0,953	0,013	Se(1)

 Tabla 45. Valor del índice Kappa de los test en relación al método de referencia |

TEST DE REFERENCIA	AISLAMIENTO
	Valor del índice Kappa
Aglutin. con RB en microplaca	0,957
Fijación de complemento	NO ESTIMADO (*)
Aglut. RB + FC	0,961
ELISAc Svanova	0,928
ELISAI Svanova	0,961
ELISAI Idexx	0,935

(\*) No se estimó debido al elevado número de sueros negativos con PA (24 sueros)

El valor del índice Kappa fue muy elevado para todos los test con respecto al método de referencia (tablas 44 y 45). En todos los casos el valor estuvo muy por encima de 0,80 considerado como un valor "casi perfecto" (tabla 15). Además, este índice Kappa presentó un valor añadido por estar obtenido en las peores condiciones posibles: prevalencia baja del carácter estudiado, prevalencias prácticamente iguales para los dos métodos y ambas simétricas con respecto a la prevalencia más ventajosa para el índice Kappa

166

### 3.2.2. Criterio de comparación relativo

Para evaluar el comportamiento de los test de ELISA en condiciones de campo durante la realización de una CSG se procedió a la estimación de los parámetros de rendimiento comparando los resultados con los obtenidos por la AMRB y la FC utilizados en serie, que constituyó la forma habitual de uso de estos dos test en estos programas. Al igual que en el caso anterior, los COff utilizados fueron los recomendados por el fabricante en los test de ELISA y los establecidos por la legislación vigente en la AMRB y para la FC. En esta parte del estudio se utilizaron la totalidad de muestras seleccionadas y no sólo aquellas de valor conocido. Los valores estimados de los parámetros de rendimiento relativos se incluyen en la tabla 46.

#### 3.2.2.1 Parámetros básicos de rendimiento

Tabla 46. Valores de los parámetros de rendimiento de los ELISAs aplicando el criterio de comparación relativo

	<i>ELISAI Svanova</i>	<i>ELISAI Idexx</i>	<i>ELISAc Svanova</i>
<b>Se (%)</b>	<b>93,16</b> (90,50-95,78)	<b>84,77</b> (81,10-88,45)	<b>96,40</b> (94,42-98,38)
<b>Sp (%)</b>	<b>98,98</b> (98,55-99,42)	<b>99,24</b> (98,85-99,62)	<b>97,08</b> (96,35-97,80)
<b>Índice de validez (%)</b>	<b>98,12</b> (97,58-98,65)	<b>97,06</b> (96,40-97,73)	<b>96,98</b> (96,30-97,65)
<b>Valor predictivo + (%)</b>	<b>94,12</b> (91,66-96,58)	<b>95,16</b> (92,77-97,55)	<b>85,23</b> (81,80-88,66)
<b>Valor predictivo - (%)</b>	<b>98,81</b> (98,34-99,28)	<b>97,36</b> (96,67-98,04)	<b>99,36</b> (99,00-99,72)
<b>Índice de Youden</b>	<b>0,92</b> (0,90-0,95)	<b>0,84</b> (0,80-0,88)	<b>0,93</b> (0,91-0,95)
<b>Razón de verosimilitud +</b>	<b>91,63</b> (60,96-137,71)	<b>111,05</b> (69,03-178,64)	<b>32,98</b> (25,94-41,94)
<b>Razón de verosimilitud -</b>	<b>0,07</b> (0,05-0,10)	<b>0,15</b> (0,12-0,19)	<b>0,04</b> (0,02-0,06)
<b>Prevalencia real (%)</b>	<b>14,87</b> (13,49-16,24)	<b>15,03</b> (13,65-16,42)	<b>14,89</b> (13,50-16,27)
<b>Índice de rendimiento (Se + Sp)</b>	<b>192,14</b> (189,05-195,02)	<b>184,01</b> (184,01-188,07)	<b>193,48</b> (190,77-196,18)

(Los valores entre paréntesis corresponden a los obtenidos para un intervalo de confianza del 95%)



Con este grupo de muestras se observó un aumento importante de la prevalencia en relación a la obtenida con el grupo de muestras utilizadas con el criterio de comparación absoluto. La diferencia tan acusada radicó en el hecho de que en este grupo se incluyeron un total de 107 sueros de animales positivos a AMRB+FC, pero de los que no se había obtenido aislamiento y que no se utilizaron para el criterio de comparación absoluto.

Como era de esperar, los valores de los parámetros obtenidos con el criterio de comparación relativo son menores que los obtenidos con el criterio de comparación absoluto.

La Se del ELISAI Idexx fue significativamente menor que la obtenida con los otros ELISAs. Sin embargo, la Sp del ELISAc Svanova fue significativamente menor que las de los otros ELISAs. El índice de validez fue elevado para los tres test y no presentó diferencias significativas entre ellos. El VPN fue elevado para los tres ELISAs y no presentó diferencias significativas entre ellos, pero, al igual que con el criterio de comparación absoluto, el VPP del ELISAc Svanova fue significativamente menor que el obtenido para los otros ELISAs. En relación al índice de Youden, el ELISAI Idexx presentó el valor más bajo y significativamente menor que el obtenido para los otros ELISAs.

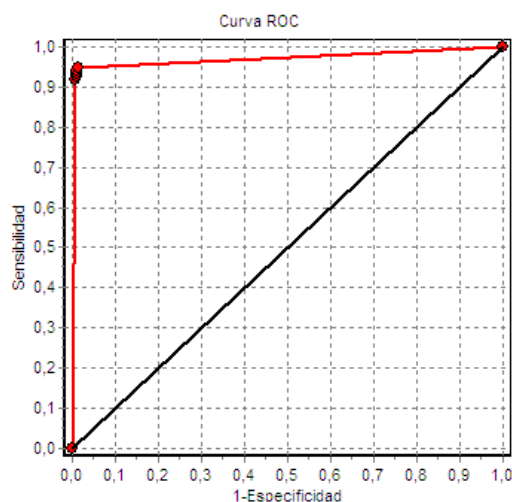
Los valores de RV+ fueron mucho más bajos que los obtenidos con el criterio de comparación absoluto, pero aportarían información “amplia” para todos los test, aunque la del ELISAc Svanova fue significativamente menor que la de los otros dos ELISAs. En relación a la RV- se estimó también según la recomendación de Delgado y Llorca (2002) obteniéndose los siguientes resultados: 14,47 para el ELISAI Svanova, para el ELISAI Idexx el valor obtenido fue de 6,51 y para el ELISAc Svanova fue de 26,77. Para este parámetro, el valor obtenido para el ELISAI Idexx fue claramente inferior al de los otros ELISAs y la información que aportaría sería “moderada” a diferencia de la de los otros dos ELISAs que sería “amplia”.

El valor del RI para el ELISAI Idexx fue claramente inferior al obtenido por los otros test independientemente del criterio de comparación utilizado. Además, presentó diferencias significativas en relación al obtenido para el ELISAI Svanova y para el ELISAc Svanova.

### 3.2.2.2 Curvas ROC

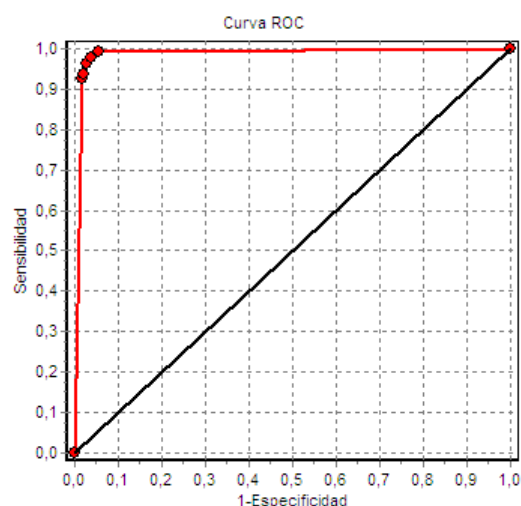
Figura 57. Curvas ROC de los tres ELISAs aplicando el criterio de comparación relativo

ELISAI Svanova



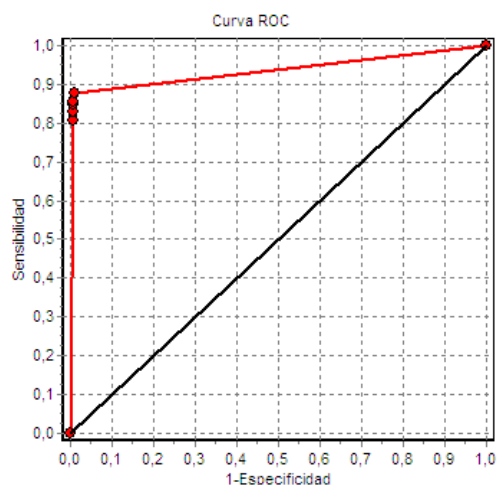
Área ROC	EE	IC(95%)		
0,9706	0,0056	0,9595	0,9816	Delong
	0,0060	0,9588	0,9823	Hanley & McNeil

ELISAc Svanova



Área ROC	EE	IC(95%)		
0,9858	0,0028	0,9804	0,9912	Delong
	0,0042	0,9775	0,9941	Hanley & McNeil

ELISAI Idexx



Área ROC	EE	IC(95%)		
0,9356	0,0083	0,9193	0,9519	Delong
	0,0087	0,9186	0,9527	Hanley & McNeil

Al igual que con el criterio de comparación absoluto, en todos los ELISAs, para la obtención de las curvas, se utilizaron 5 tablas de 2x2, con un nivel de confianza del 95%, para la obtención de 5 valores que incluían el valor del COff del test y dos valores por encima y dos por debajo de éste, a la misma distancia. El test que presentó la AUC mayor fue el ELISAc Svanova (0,9858), a continuación fue el ELISAI Svanova (0,9706) y, por último el ELISAI Idexx (0,9356). El orden fue el mismo que el obtenido con el criterio de comparación absoluto (figura 57).

Los mismos comentarios realizados para las curvas ROC obtenidas con respecto al método de referencia serían válidos en esta situación, con la salvedad de que el valor del AUC fue especialmente menor para el ELISAI Idexx, algo menor para el ELISAI Svanova y se mantuvo para el ELISAc Svanova (figura 57).

El AUC del ELISAI Idexx fue significativamente menor que las obtenidas para los otros dos ELISAs.

### 3.2.2.3 Índice Kappa

Tabla 47. Obtención del índice Kappa para los diferentes test aplicando el criterio de comparación relativo

Intervalo de confianza: 95 %

Test estándar

AMRB + FC

Test alternativo

ELISAi Svanova

Test alternativo

Test estándar

A

B

C

Total

a

368

23

391

b

27

2.239

2.266

c

Total

395

2.262

2.657

Kappa

Lim. Inf.

Lim. Sup.

0,887

0,963

0,019

Se(0)

0,925

0,905

0,946

0,010

Se(1)

Intervalo de confianza: 95 %

Test estándar

AMRB + FC

Test alternativo

ELISAi Idexx

Test alternativo

Test estándar

A

B

C

Total

a

334

17

351

b

60

2.210

2.270

c

Total

394

2.227

2.621

Kappa

Lim. Inf.

Lim. Sup.

0,841

0,918

0,019

Se(0)

0,880

0,853

0,906

0,013

Se(1)

Intervalo de confianza: 95 %

Test estándar

AMRB + FC

Test alternativo

ELISAc Svanova

Test alternativo

Test estándar

A

B

C

Total

a

375

65

440

b

14

2.159

2.173

c

Total

389

2.224

2.613

Kappa

Lim. Inf.

Lim. Sup.

0,849

0,925

0,020

Se(0)

0,887

0,862

0,911

0,012

Se(1)

El índice Kappa obtenido para los tres test en esta situación fue superior al 0,80 (tabla 47). Este resultado se consideraría “casi perfecto” (tabla 15).

Tabla 48. Resumen de los valores del AUC y del índice Kappa para los ELISAs en las situaciones estudiadas

Los valores entre paréntesis indican el rango para un intervalo de confianza del 95%	Area ROC		Índice Kappa	
	Gold standard	Método relativo	Gold standard	Método relativo
<b>ELISAi Svanova</b>	<b>0,9801</b> (0,9676-0,9926)	<b>0,9709</b> (0,9595-0,9816)	<b>0,961</b> (0,920-1,002)	<b>0,925</b> (0,887-0,963)
<b>ELISAi Idexx</b>	<b>0,9609</b> (0,9436-0,9782)	<b>0,9356</b> (0,9193-0,9519)	<b>0,935</b> (0,894-0,976)	<b>0,880</b> (0,841-0,918)
<b>ELISAc Svanova</b>	<b>0,9856</b> (0,9758-0,9955)	<b>0,9858</b> (0,9804-0,9912)	<b>0,928</b> (0,887-0,969)	<b>0,887</b> (0,849-0,925)

En la tabla 48 se mostraron los datos del AUC y del índice Kappa obtenidos con los tres ELISAs con ambos criterios de comparación. La AUC de los ELISAi y ELISAc Svanova fueron superiores a la del ELISAi Idexx para ambos criterios, existiendo diferencias significativas para la AUC con el criterio de comparación relativo. El índice Kappa fue “casi perfecto” para todos los test y con ambos criterios, especialmente para el ELISAi Svanova.

### 3.3. Resultados por grupos de muestras en diferentes situaciones epidemiológicas

En las tablas de resultados desde la 49 a la 56, solo se incluyeron los resultados a FC de aquellas muestras que previamente no presentaron un resultado negativo a AMRB debido a que, en la realización de las CSG, las muestras con resultado negativo a este test no se analizaron a la FC. A continuación se muestran las tablas de resultados y los gráficos correspondientes a cada uno de los grupos de sueros.

#### 3.3.1 Sueros positivos de animales con aislamiento (grupo A)

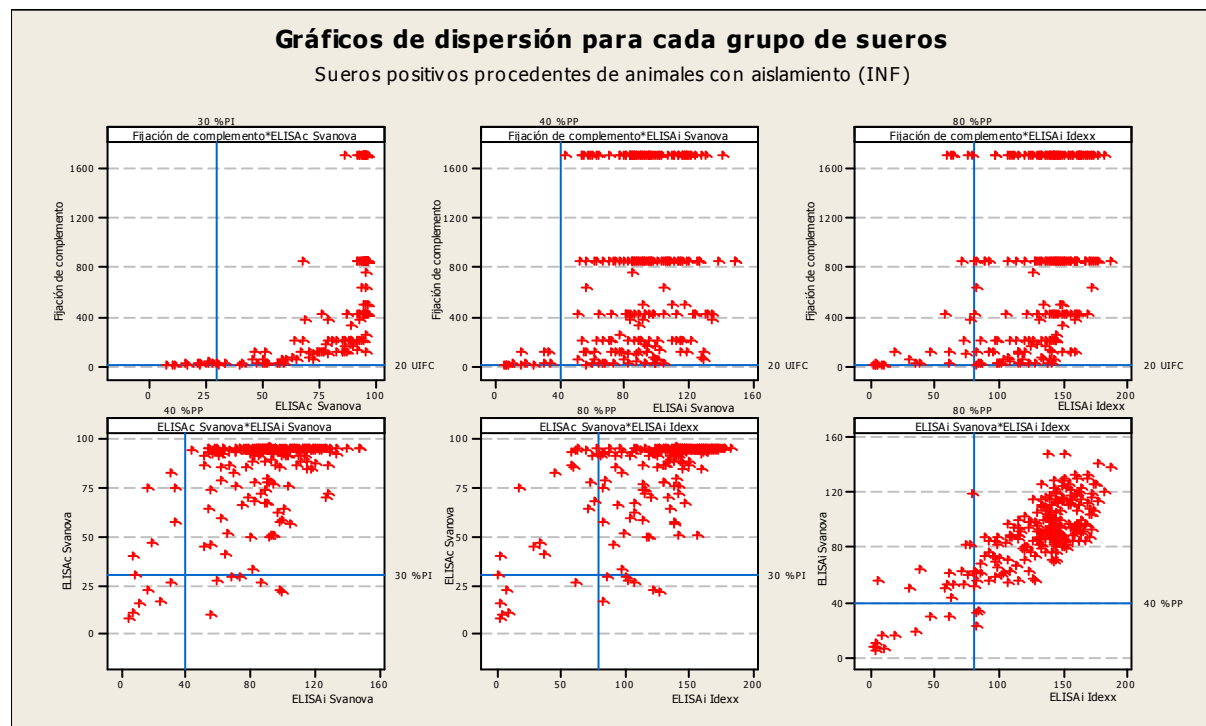
El total de sueros investigados fue de 232. Resultaron positivos a todos los ensayos 194 sueros. Solo hubo tres sueros con resultado negativo a todos los ensayos y dos sueros con resultado positivo a todos los ensayos excepto a AMRB (tabla 49).

**Tabla 49. Resultados obtenidos por los diferentes test con el grupo de sueros positivos con aislamiento**

	AMRB	FC	ELISAc Svanova	ELISAI Svanova	ELISAI Idexx
<b>Negativo</b>	11	5	12	13	24
<b>Positivo</b>	221	216	216	219	208
<b>Muestras analizadas</b>	<b>232</b>	<b>221 (*)</b>	<b>228</b>	<b>232</b>	<b>232</b>

(\*) Se analizaron a FC sólo aquellas muestras con resultado positivo a AMRB

**Figura 58. Gráficos de dispersión de los resultados de animales con aislamiento positivo (grupo A)**



En el gráfico de dispersión de la figura 58, el ELISAc Svanova es el que presentó el comportamiento más parecido a la FC. También resultó peculiar el hecho de que varias muestras con títulos a FC mayores de 400 UIFC fueron detectadas por los ELISAI muy próximas al COff y algunas de ellas ni tan siquiera fueron detectadas como positivas por el ELISAI Idexx.

Entre los ELISAI se vio una correlación muy buena incluso en lo referente al nivel de Ac detectados por cada uno de ellos. El gráfico indica que si se modificase ligeramente el COff, el ELISAI Idexx sería capaz de detectar bastantes más positivos.

En relación a la correlación entre los ELISAs se puede apreciar que ésta es mejor entre los ELISAs de Svanova que entre éstos y el ELISAI Idexx.

### 3.3.2 Sueros de animales con conversión del título (grupo B)

Los resultados de los análisis de las muestras de la primera extracción se indican en la tabla 50 y los de la segunda en la tabla 51. En la fila de “muestras analizadas” de ambas tablas figura el número total de muestras analizadas con cada test. El total de muestras obtenidas fue de 40 para cada extracción y como se puede observar, algunas muestras no se analizaron a determinados test por no disponer de suero suficiente.

En la primera extracción, una de las muestras fue negativa a la AMRB, a la FC y al ELISAc Svanova y no se pudo investigar a los ELISAI por falta de suero. En la segunda extracción fue positiva a la AMRB y al ELISAc Svanova, pero presentó PA a FC y fue negativa a los dos ELISAI.

**Tabla 50. Resultados de los test con sueros de la primera extracción de animales con conversión de Ac**

	AMRB	FC	ELISAc Svanova	ELISAI Svanova	ELISAI Idexx
<b>Negativo</b>	38	2 (**)	31	35	32
<b>Positivo</b>	2	0	9	4	3
<b>Muestras analizadas</b>	<b>40</b>	<b>2 (*)</b>	<b>40</b>	<b>39</b>	<b>35</b>

(\*) Se analizaron a FC sólo aquellas muestras con resultado positivo a AMRB

(\*\*) Una de las muestras consideradas negativas a FC en esta tabla, en realidad presentó PA

En la primera extracción, nueve muestras fueron positivas al ELISAc y dos de ellas fueron positivas a todos los test, excepto a FC con el que se obtuvo un resultado negativo. Las siete restantes sólo fueron positivas a este ELISA, si bien dos de ellas no fueron investigadas con el ELISAI Idexx por falta de suero. En esta extracción, los ELISAI detectaron cuatro muestras como positivas entre los dos, coincidiendo en tres de ellas. La cuarta muestra solo fue detectada por el ELISAI Svanova.

En esta primera extracción, el ELISAc Svanova clasificó como positivos más del doble de sueros que los dos ELISAI juntos.

Tabla 51. Resultados de los test con sueros de la segunda extracción de animales con conversión de Ac

	AMRB	FC	ELISAc Svanova	ELISAI Svanova	ELISAI Idexx
Negativo	0	0	3	5	12
Positivo	40	39 (**)	37	35	27
Muestras analizadas	40	40 (*)	40	40	39

(\*) Se analizaron a FC sólo aquellas muestras con resultado positivo a AMRB

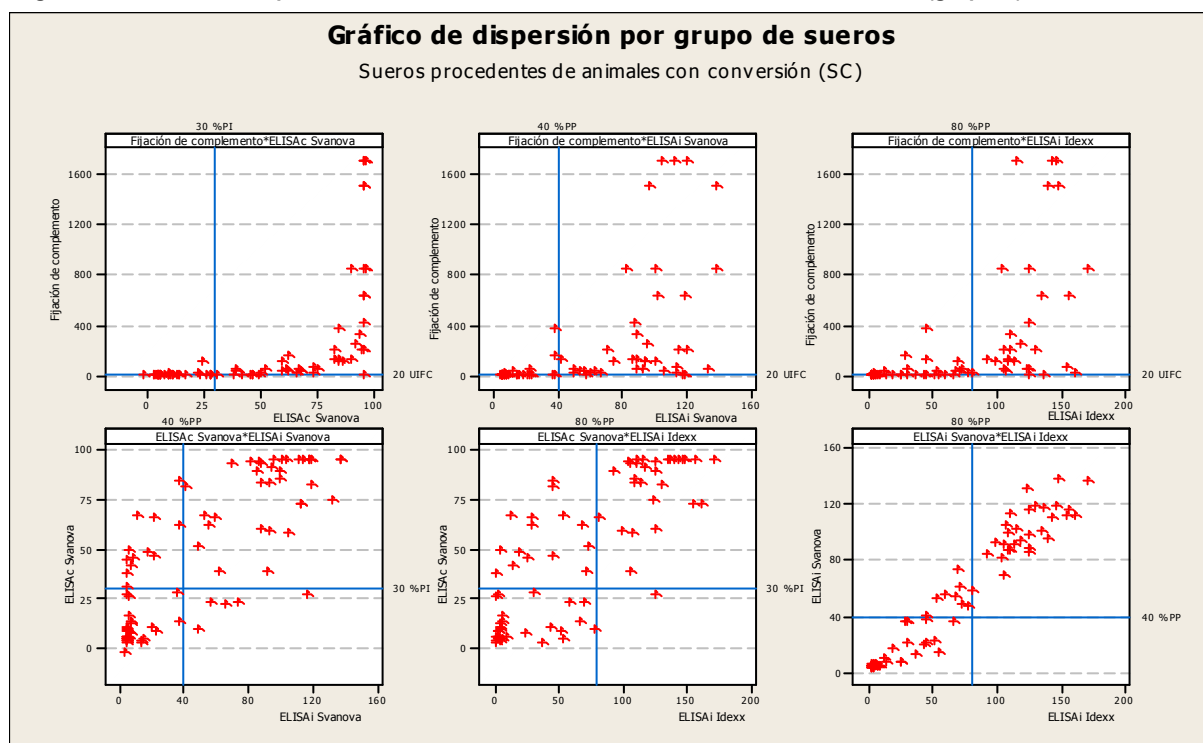
(\*\*) El análisis de una muestra a FC presentó un resultado con PA. Ver explicación en texto

Los datos de la tabla 51 muestran los resultados de la segunda extracción. En este análisis, el número de muestras detectadas como positivas por los ELISAs está claramente incrementado en relación a la primera extracción. Las nueve muestras detectadas como positivas por el ELISAc Svanova en la primera extracción fueron detectadas como positivas por todos los ELISAs, en la segunda.

Las tres muestras negativas al ELISAc Svanova fueron positivas a AMRB, dos positivas y una con PA a la FC, tres positivas al ELISAI Svanova y dos negativas y una no analizada al ELISAI Idexx.

Los ELISAI clasificaron un total de 12 muestras como negativas. Las cinco muestras negativas a ELISAI Svanova también lo fueron al ELISAI Idexx, pero todas fueron positivas a AMRB, a FC y al ELISAc. De las siete restantes negativas al ELISAI Idexx, cinco de ellas presentaron un resultado positivo a todos los otros test.

Figura 59. Gráficos de dispersión de los resultados de animales con conversión del título (grupo B)



El gráfico de dispersión para este grupo de sueros presentó unas características muy similares a las del grupo A, sueros positivos de animales con aislamiento. Los ELISAI presentaron una correlación menor con la FC que el ELISAc Svanova. La correlación entre los ELISAI fue muy elevada (figura 59).

### 3.3.3 Sueros positivos de animales sin aislamiento (grupo C)

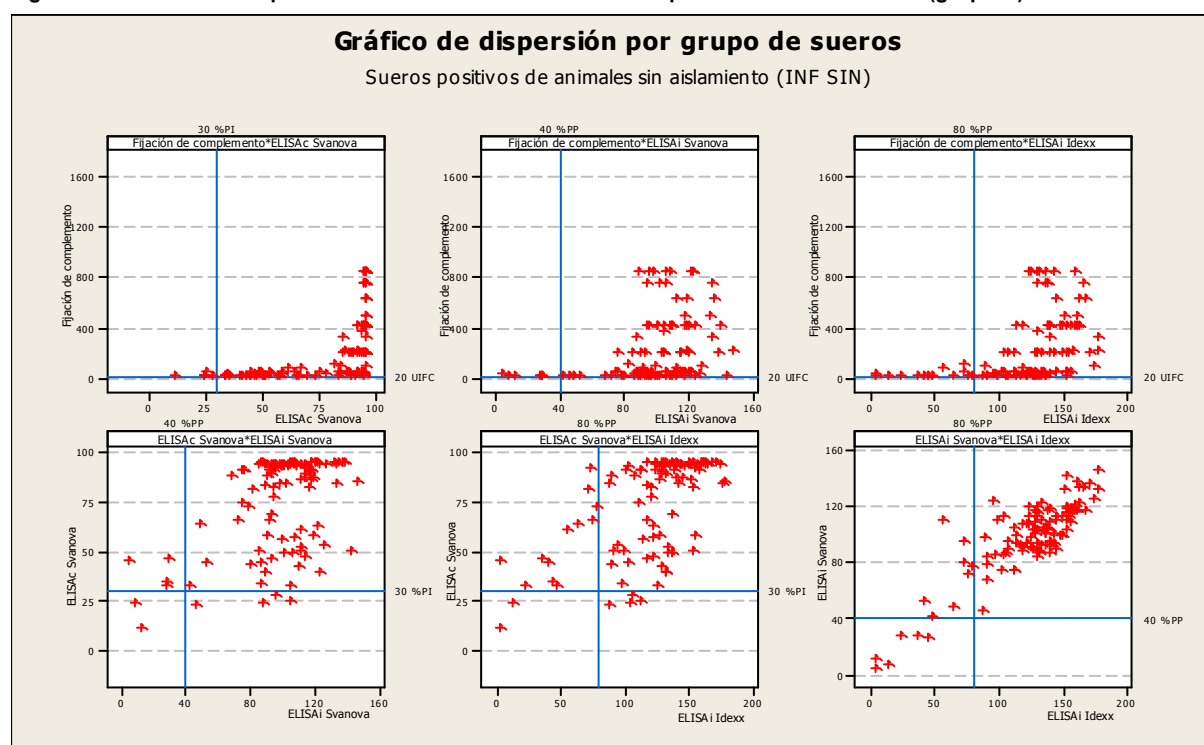
Todas estas muestras presentaron un resultado positivo a AMRB y a FC utilizados en serie. De los 108 sueros seleccionados, dos fueron negativos a los tres ELISAs y 87 fueron positivos a los tres ELISAs. El resto de los sueros resultaron positivos a uno o dos ELISAs. En la tabla 52 se muestran los resultados obtenidos con los diferentes test. En este grupo resulta especialmente significativo, al igual que en el grupo anterior, el comportamiento del ELISAI de Idexx que clasifica como negativos ocho sueros más que los ELISAs de Svanova.

Tabla 52. Resultados de todos los test con los sueros de animales positivos sin aislamiento (grupo C)

	AMRB	FC	ELISAc Svanova	ELISAI Svanova	ELISAI Idexx
Negativo	0	0	6	6	14
Positivo	108	108	99	101	93
Muestras analizadas	108	108 (*)	105	107	107

(\*) Se analizaron a FC solo aquellas muestras con resultado positivo a AMRB

Figura 60. Gráficos de dispersión de los resultados de animales positivos sin aislamiento (grupo C)



El gráfico de dispersión de este grupo presentó un comportamiento de los test similar al observado para el grupo A, sueros positivos de animales con aislamiento (figura 60). Resultó destacable para este grupo el que ninguno de los sueros presentase un título superior a las 800 UIFC.

### 3.3.4 Sueros negativos de animales oficialmente indemnes (grupo D)

El total de sueros investigados fue de 2107. Las siete muestras con resultado positivo a AMRB se analizaron a la FC obteniéndose para todas ellas un resultado negativo. Cabe destacar el mayor número de sueros clasificados como positivos por el ELISAc Svanova en relación a los ELISAi (tabla 53).

**Tabla 53. Resultados obtenidos por los diferentes test con el grupo de sueros negativos (grupo D)**

	AMRB	FC	ELISAc Svanova	ELISAi Svanova	ELISAi Idexx
<b>Negativo</b>	2.100	7	2041	2.099	2.068
<b>Positivo</b>	7	0	18	3	2
<b>Muestras analizadas</b>	<b>2107</b>	<b>7 (*)</b>	<b>2.041</b>	<b>2.102</b>	<b>2.070</b>

(\*) Se analizaron a FC sólo aquellas muestras con resultado positivo a AMRB

### 3.3.5 Sueros negativos acompañantes de infectados (grupo E)

De los sueros incluidos en este grupo, 45 fueron negativos a AMRB y no se analizaron a FC, los otros 21 resultaron positivos a AMRB y fueron analizados a FC obteniéndose un resultado negativo. Por tanto, todos los animales fueron considerados negativos en el ámbito de la CSG (tabla 54).

**Tabla 54. Resultados obtenidos con los sueros de animales negativos acompañantes de infectados (grupo E)**

	AMRB	FC	ELISAc Svanova	ELISAi Svanova	ELISAi Idexx
<b>Negativo</b>	45	21	37	55	60
<b>Positivo</b>	21	0	29	11	6
<b>Muestras analizadas</b>	<b>66</b>	<b>21 (*)</b>	<b>66</b>	<b>66</b>	<b>66</b>

(\*) Se analizaron a FC sólo aquellas muestras con resultado positivo a AMRB

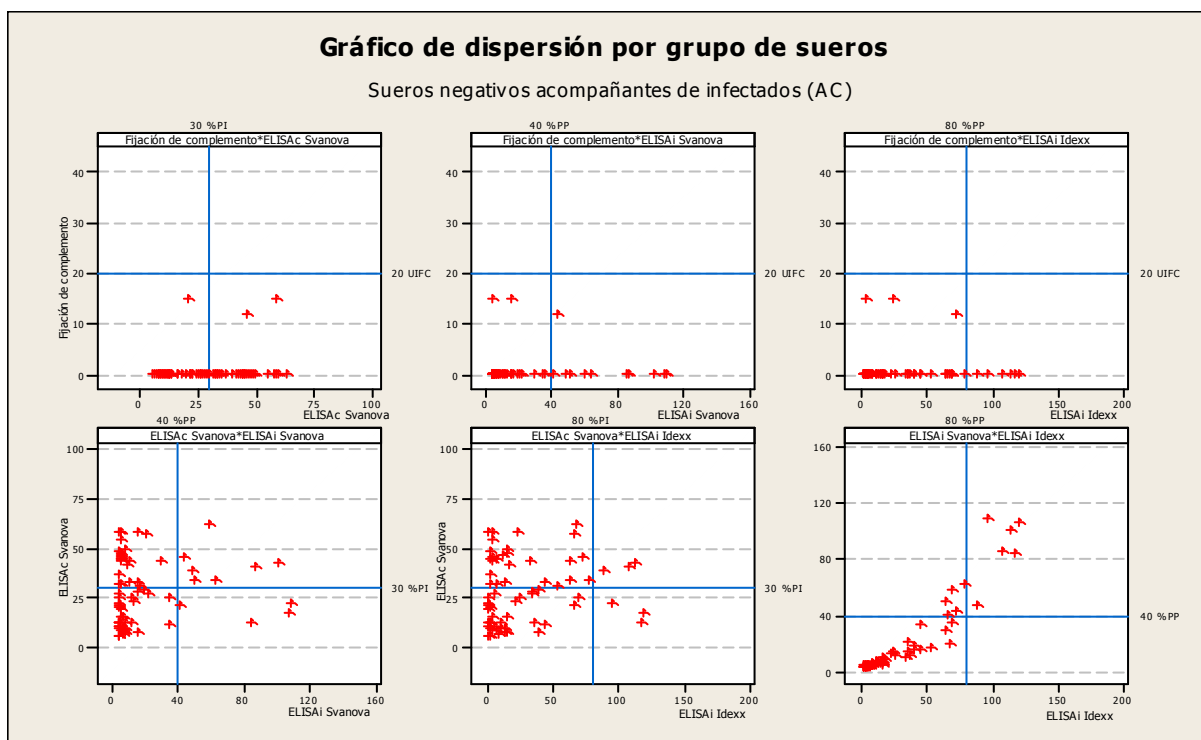
Los ELISAs detectaron un total de 33 positivos, pero solo tres lo fueron a todos los ELISAs. Sin embargo, estos mismos test coincidieron en la clasificación como negativos de 33 sueros. Los seis sueros positivos al ELISAi Idexx también lo fueron al ELISAi Svanova y solo tres de éstos lo fueron positivos al ELISAc Svanova. Entre la AMRB y el ELISAc



Svanova clasificaron como positivos 41 sueros, pero sólo presentaron un resultado coincidente en nueve de ellos. Estos mismos test clasificaron en conjunto un total de 57 sueros como negativos de los que 25 fueron clasificados igual por ambos (tabla 54).

La figura 61 muestra los gráficos de dispersión para los sueros del grupo E. Los aspectos más significativos lo constituyeron la elevada correspondencia entre los ELISAI y la mejor correlación entre el ELISAI Svanova y el ELISAc Svanova que entre éste y el ELISAI Idexx. En conjunto, los tres ELISAs se comportaron de manera similar en relación a la FC, aunque la mayor correlación se observó con respecto al ELISAI de Idexx.

**Figura 61. Gráficos de dispersión de los resultados de animales negativos acompañantes de infectados (grupo E)**



### 3.3.6 Sueros con poder anticomplementario (grupo F)

Los animales de este grupo fueron investigados a FC independientemente del resultado obtenido a la AMRB. El número de sueros de este grupo fue de 40. El ELISAc Svanova clasificó cuatro animales como positivos. Los ELISAI clasificaron a todos los animales como negativos (tabla 55).

La figura 62 muestra la correlación entre los diferentes test en la que se puede apreciar los sueros positivos clasificados por el ELISAc Svanova.

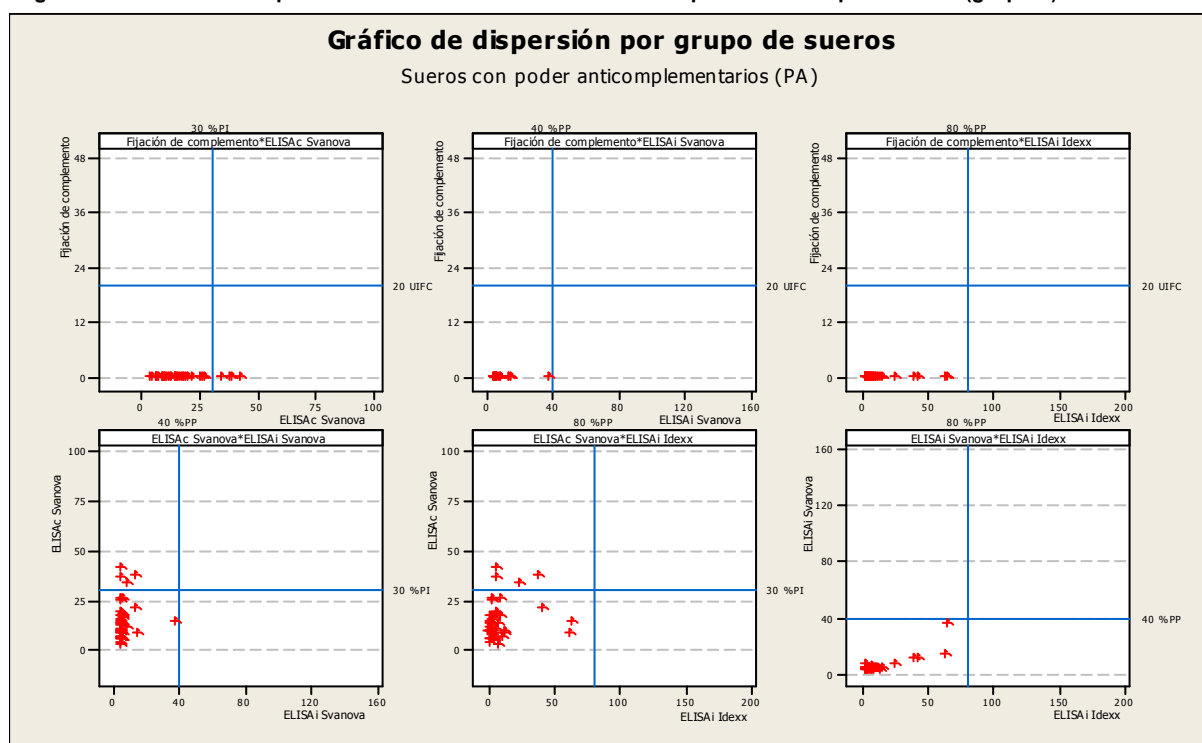
Tabla 55. Resultados obtenidos por los diferentes test con el grupo de sueros con poder anticomplementario

	AMRB	FC	ELISAc Svanova	ELISAI Svanova	ELISAI Idexx
Negativo	39	(**)	36	40	40
Positivo	1	(**)	4	0	0
Muestras analizadas	40	40 (*)	40	40	40

(\*) Todos los sueros fueron analizados a FC independientemente del resultado a AMRB

(\*\*) Todos los sueros presentaron PA a FC

Figura 62. Gráficos de dispersión de los resultados de sueros con poder anticomplementario (grupo F)



### 3.3.7 Sueros falsos positivos (grupo G)

Los resultados obtenidos con este grupo de sueros se muestran en la tabla 56. Los ELISAI son los test que clasifican un mayor número de muestras como negativas. De los 31 sueros investigados, 12 resultaron positivos a todos los ensayos, pero solo dos fueron positivos a los tres ELISAs. Un suero positivo a AMRB y a FC resultó negativo a los tres ELISAs. Otro suero positivo a AMRB y a FC en la primera extracción solo fue positivo a FC en la segunda extracción y negativo a AMRB y a los tres ELISAs.

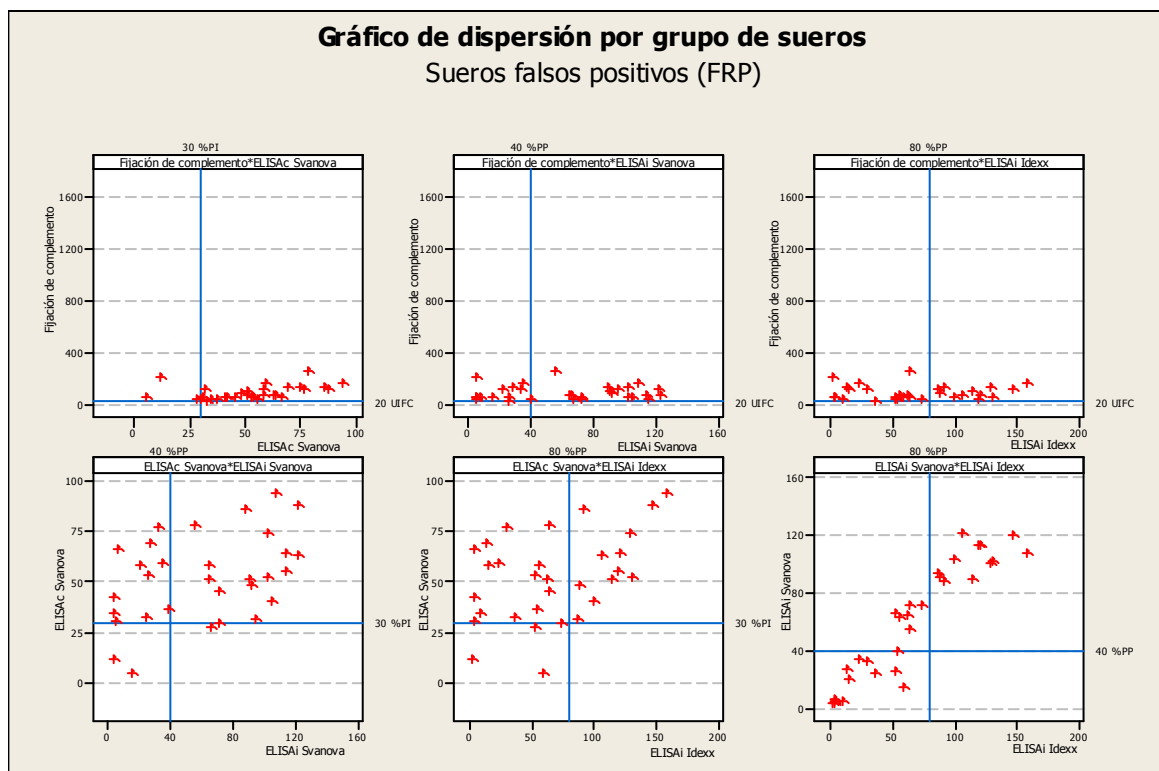
Tabla 56. Resultados de los test con los sueros clasificados como falsos positivos

	AMRB	FC	ELISAc Svanova	ELISAI Svanova	ELISAI Idexx
Negativo	1	0	3	13	19
Positivo	30	31	28	18	12
Muestras analizadas	31	31 (*)	31	31	31

(\*) Se analizaron a la FC todas las muestras incluidas en este grupo independientemente del resultado a AMRB

En la figura 63 se muestran los gráficos de dispersión obtenidos para este grupo de sueros. En ellos se puede observar como el ELISAc Svanova es el test que se comporta de manera más semejante a la FC. También, como sucede en otros grupos de muestras, el comportamiento entre los ELISAI es muy similar. Sin embargo, existen seis sueros clasificados como negativos por el ELISAI Idexx muy próximos al COff, si este valor se modificara para este test, probablemente estos seis sueros pasarían a considerarse como positivos. El comportamiento entre el ELISAc Svanova y los ELISAI es bastante dispar y el número de sueros clasificados de forma diferente es elevado, la mayor parte de ellos en el grupo de sueros positivos para el ELISAc Svanova y negativos para los ELISAI. Sin embargo, como sucede con otros grupos de muestras el comportamiento entre el ELISAc Svanova y el ELISAI Svanova es más coherente que entre el ELISAc Svanova y el ELISAI Idexx.

Figura 63. Gráficos de dispersión de los resultados de sueros clasificados como falsos positivos



### **3.4. Distribución de los sueros en el rango de detección de los ELISAs**

Desde la figura 64 hasta la 72 se representó la frecuencia de los valores del PP y del PI de todos los sueros utilizados en la extensión de la validación cuando se aplicó el criterio de comparación relativo. Para facilitar el análisis de los datos, los sueros se reagruparon en tres supergrupos en función del resultado esperado. Los supergrupos creados fueron tres: el de positivos, el de negativos y el de falsos positivos. Este último grupo quedó constituido por los sueros incluidos en el grupo de sueros falsos positivos (grupo F) utilizados en la extensión de la validación de los ELISAs. Para cada ELISA se elaboraron tres gráficos con cada uno de los supergrupos. En cada gráfico se representó mediante una línea perpendicular de color rojo el COff de cada test establecido por el fabricante: 40 para el ELISAI Svanova, 80 para el ELISAI Idexx y 30 para el ELISAc Svanova. En estos gráficos las muestras que presentaban un especial interés eran las distribuidas por las zonas próximas al COff ya que serían las afectadas por las modificaciones del Coff. Debido a este hecho y para mejorar la visión de los datos, para el supergrupo de negativos no se representaron la totalidad de las muestras (figuras 67, 68 y 69).

Las figuras desde la 64 hasta 69 incluyeron los supergrupos positivos y negativos. Para los tres test se observó una separación clara para la mayor parte de los sueros positivos y negativos, sobre todo con el ELISAc Svanova, que concentró el número más elevado de ellos en los extremos correspondientes. Los sueros positivos aparecieron distribuidos en la mayor parte del rango de detección a diferencia de los negativos que se concentraron en mayor medida en la zona izquierda de la tabla. El grado de solapamiento de sueros positivos y negativos en las zonas próximas al COff fue mayor en el ELISAc Svanova que en los dos ELISAI.

Las figuras 64, 65 y 66 incluyeron las muestras del supergrupo de positivos. Los ELISAI presentaron una zona de concentración de los sueros aproximadamente en la mitad del rango de la zona de positivos, siguiendo un patrón similar para ambos test. En el ELISAc los positivos se concentraron al final del rango de detección del test (extremo derecho del gráfico). Para todos los test, los sueros obtenidos en la primera extracción de los animales con conversión del título (grupo B) se concentraron en la zona de detección de negativos (extremo izquierdo del gráfico).

Las figuras 67, 68 y 69 incluyeron las muestras del supergrupo negativos. Los tres ELISAs presentaron un patrón bastante similar, concentrando los sueros del grupo de negativos oficialmente indemnes (grupo E) y los sueros del grupo con PA (grupo D) en la zona izquierda de la gráfica. Los sueros del grupo de negativos acompañantes de infectados (grupo E) también se concentraron en la parte izquierda de la gráfica, pero una parte de ellos se distribuyeron por la mayor parte del rango de detección para los ELISAI y en todo el rango de detección para el ELISAc.

Las gráficas de los sueros del supergrupo falsos positivos mostraron una distribución por todo el rango de detección para el ELISAc con una área de concentración en la zona intermedia

del rango (figura 72). Para los ELISAI el patrón de distribución fue similar entre ellos y no llegaron a ocupar todo el rango de detección de los test (figuras 70 y 71).

Como se observó en las curvas ROC la modificación del COff mejoraba claramente el comportamiento del ELISAI Idexx. En la figura 65 se observó que el descenso del COff hasta 60 mejoraba la Se del test al aumentar el número de sueros detectados como positivos en todos los grupos incluidos en el supergrupo de positivos. Además, para el supergrupo de negativos esta modificación del COff afectaría básicamente al grupo de sueros negativos acompañantes de infectados (grupo E), en menor medida, al grupo de sueros con PA (grupo F) y prácticamente no afectaría al grupo de sueros negativos de animales oficialmente indemnes (grupo D). Sin embargo, esta modificación del COff originaría una pérdida de Sp del test en relación al grupo de sueros con PA (grupo F), en el que aparecería algún caso positivo.

Para el ELISAI Svanova la modificación del COff a 30 originaría una mejora de la Se con los grupos de los sueros positivos de animales con aislamiento (grupo A), con el grupo de sueros positivos de animales sin aislamiento (grupo C) y con los sueros de la segunda extracción de los animales con conversión sin apenas efectos sobre la Sp del test.

En el ELISAc, las modificaciones del COff hacia la derecha mejorarían la Sp del test eliminando probablemente las diferencias significativas de este parámetro en relación a los valores obtenidos para los otros test (figuras 66 y 69).

Para el supergrupo de falsos positivos, la modificación del COff no produce ningún efecto significativo en los ELISAI. Para el ELISAc se produciría una mejora de su comportamiento que lo acercaría a los resultados obtenidos por los ELISAI.

En las figuras 73, 74 y 75 se compararon las AUC obtenidas para tres COff diferentes con cada uno de los test en relación a la AMRB+FC. En el pie de cada figura se especifican los COff representados correspondiendo el valor intermedio en todas ellas al COff de uso recomendado por el fabricante: 30 para el ELISAc Svanova, 40 para el ELISAI Svanova y 80 para el ELISAI Idexx. Para los tres test el descenso del COff mejoró la Se con el criterio de comparación absoluto y con el relativo (tabla 57). Este efecto fue especialmente marcado para el ELISAI Idexx. La modificación del COff en el ELISAI Svanova apenas produjo variaciones en la Se y en la Sp, apareciendo los valores muy superpuestos, el descenso del COff aumentó en mayor medida la Se de lo que empeoró la Sp. La modificación del COff para el ELISAI Idexx produjo un incremento de la Se sin que apenas se viese afectada la Sp. Para el ELISAc Svanova la modificación del COff aumentando la Se disminuyó la Sp y viceversa, aumentando la Sp disminuyó la Se.

Figura 64. Rango de distribución de sueros positivos según el valor del PP para el ELISAI Svanova

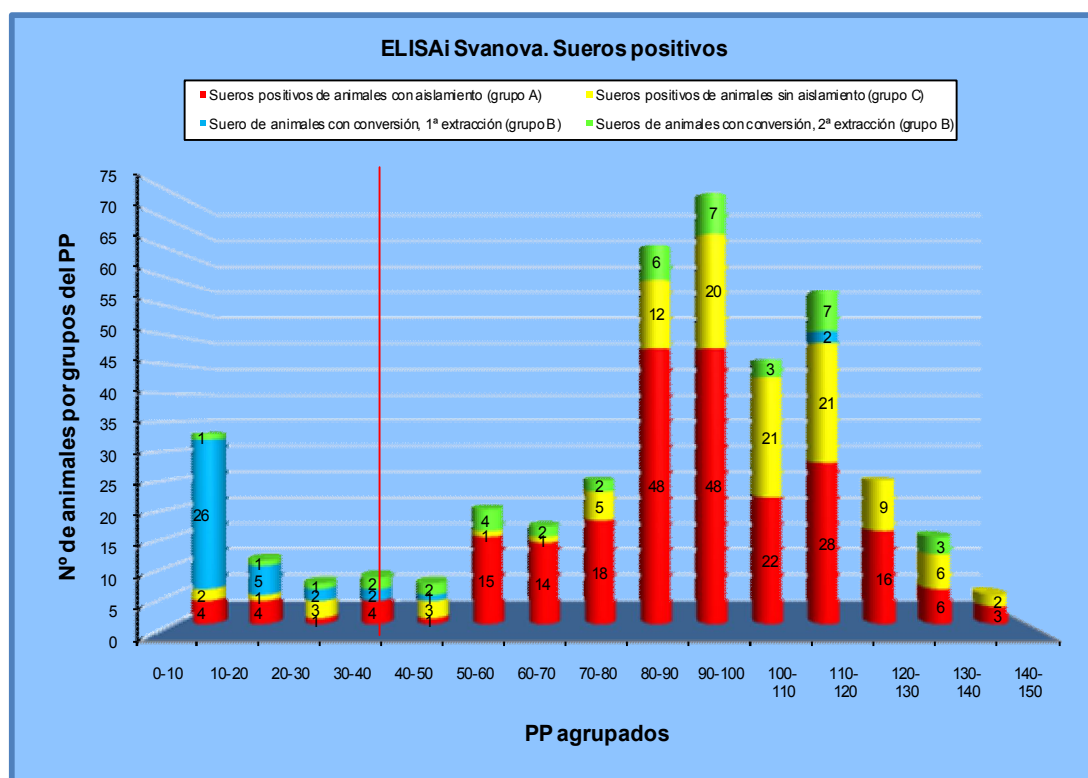


Figura 65. Rango de distribución de sueros positivos según el valor del PP para el ELISAI Idexx

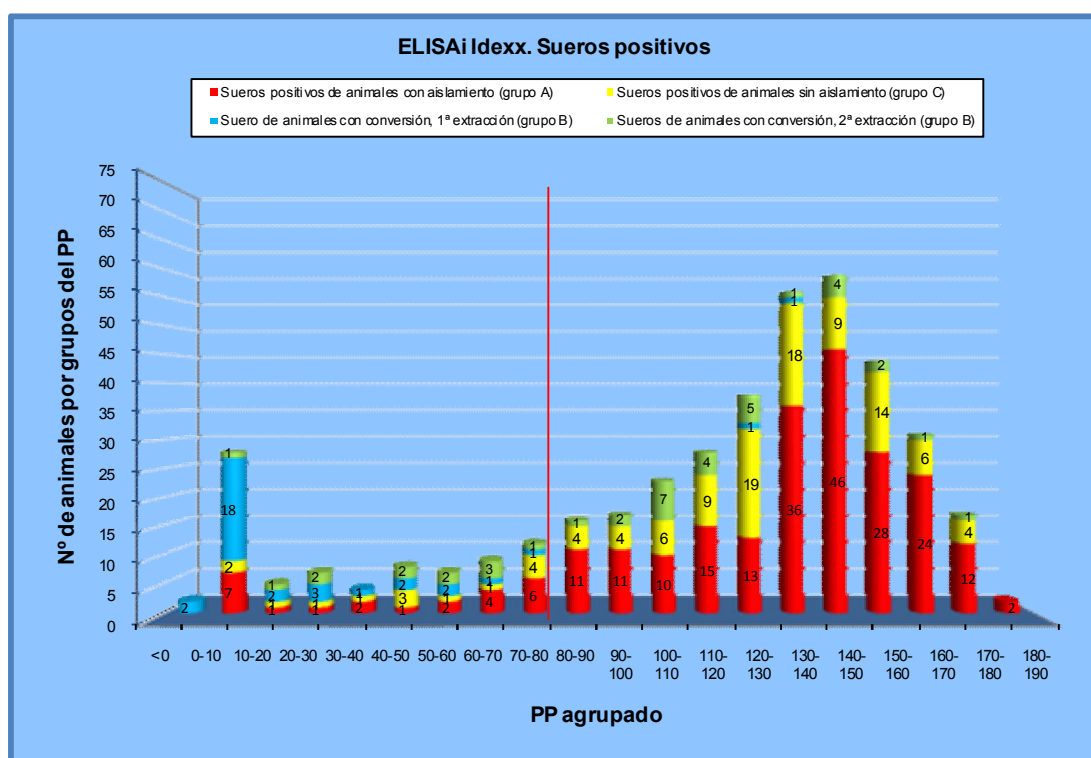


Figura 66. Rango de distribución de sueros positivos según el valor del PI para el ELISAc Svanova

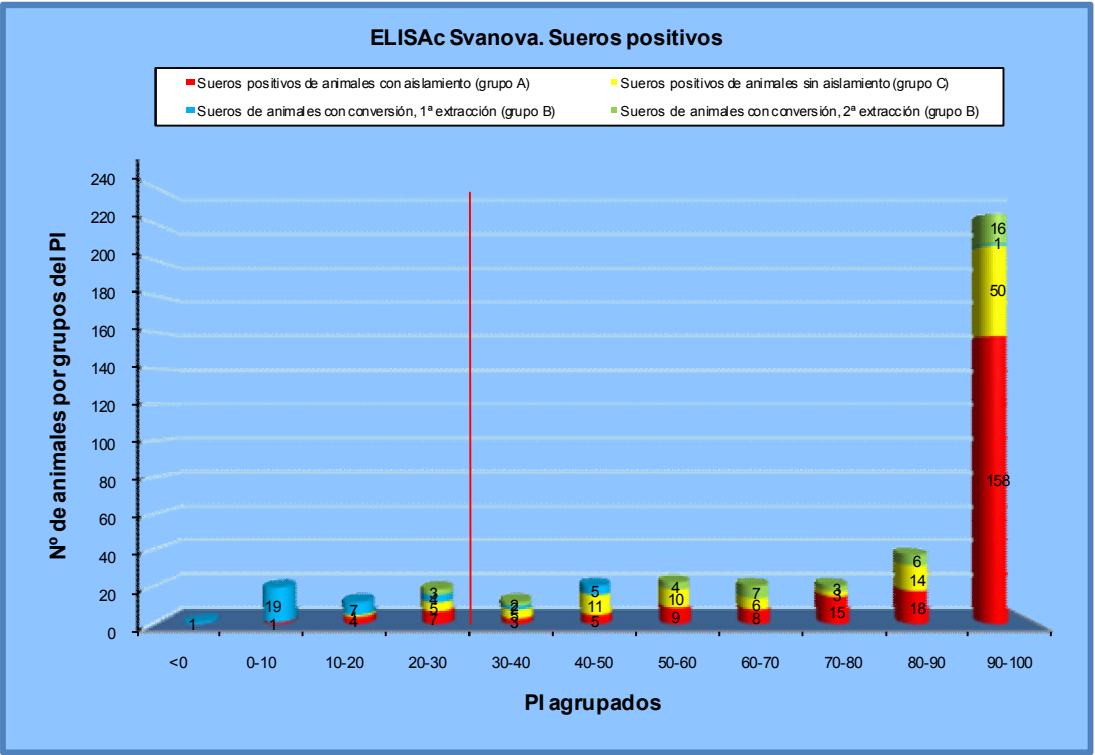


Figura 67. Rango de distribución de sueros negativos según el valor del PP para el ELISAI Svanova

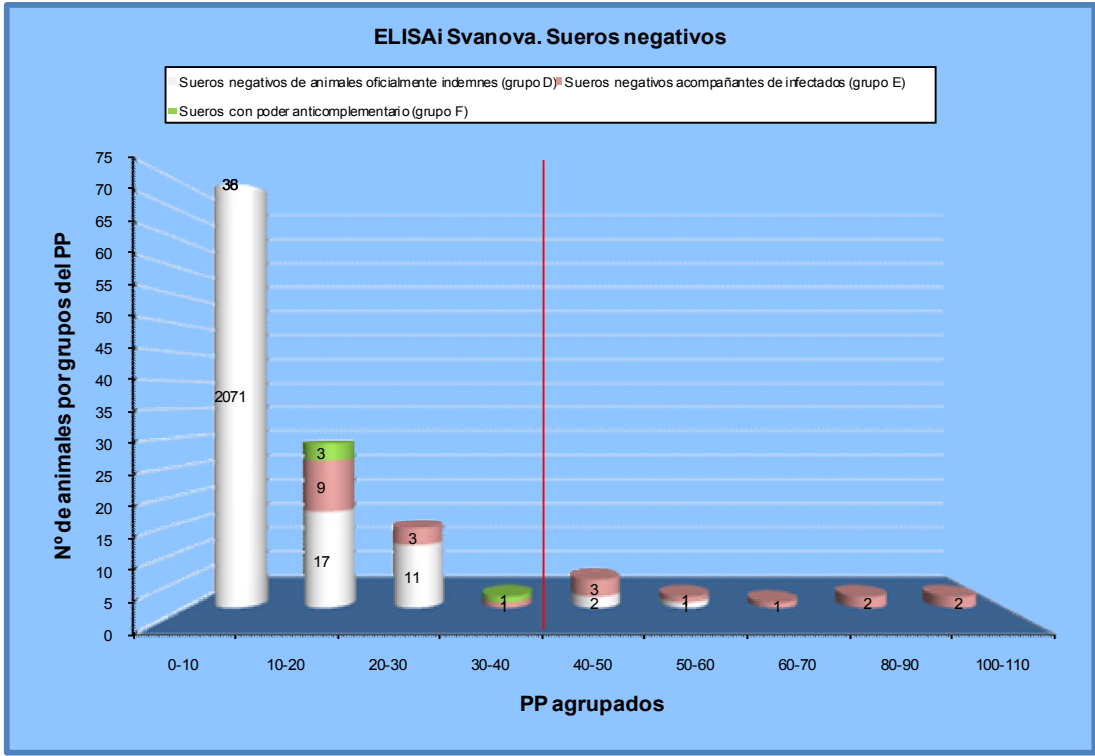


Figura 68. Rango de distribución de sueros negativos según el valor del PP para el ELISAI Idexx

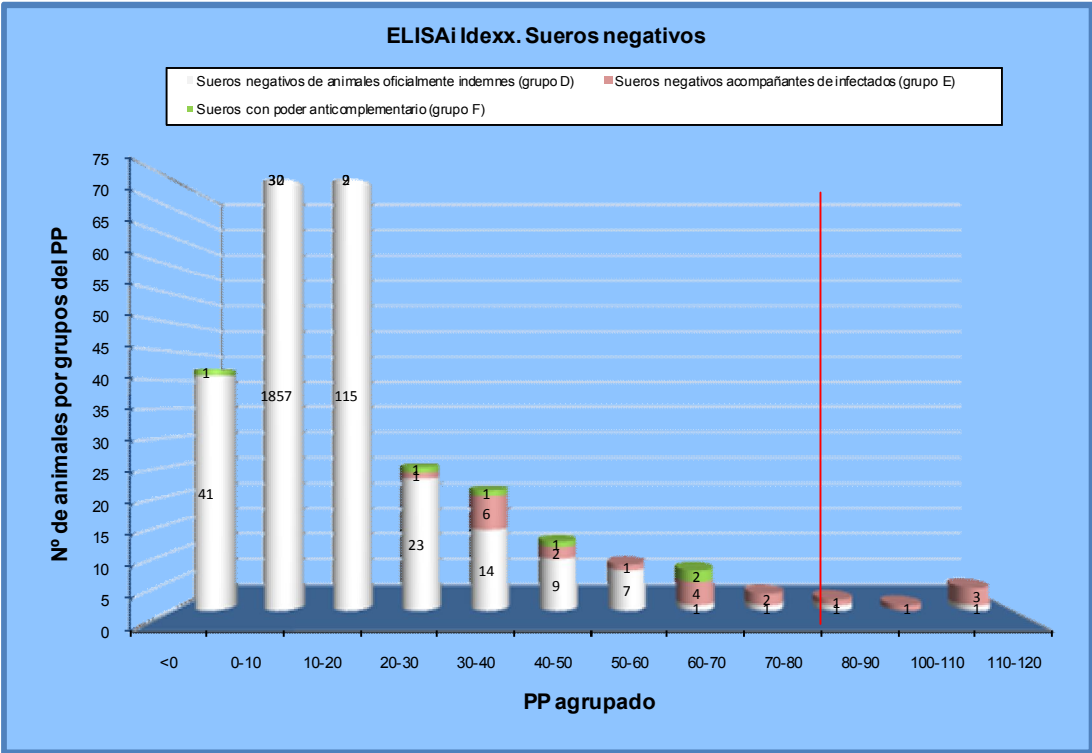


Figura 69. Rango de distribución de sueros negativos según el valor del PI para el ELISAc Svanova

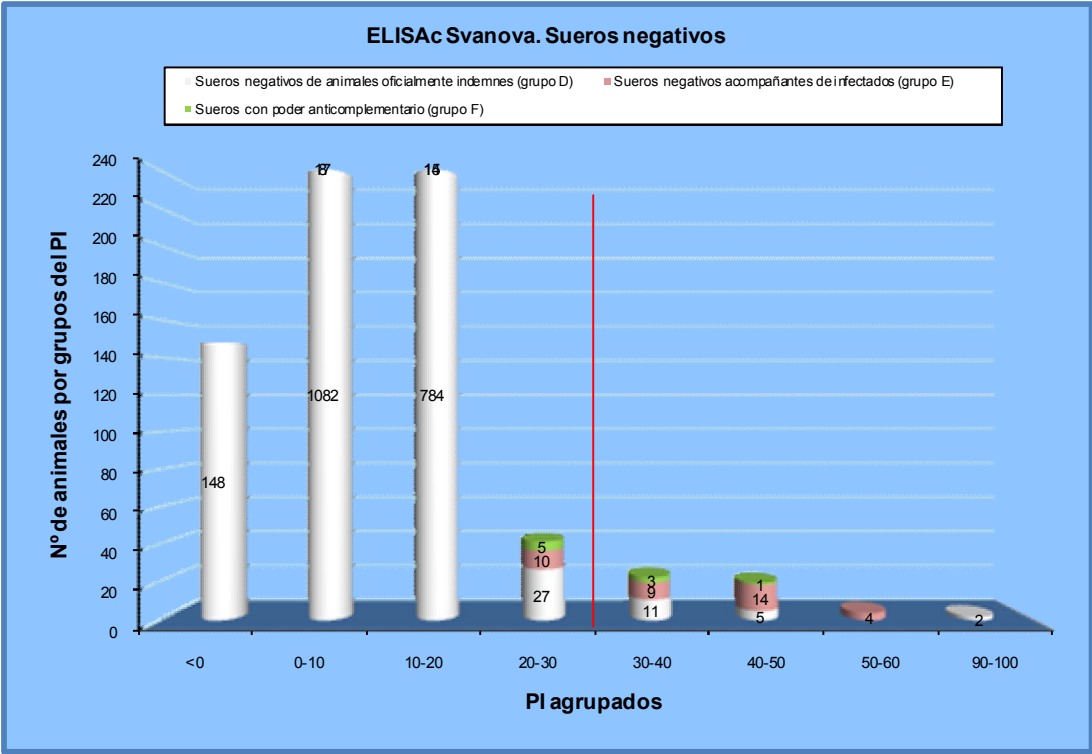




Figura 70. Rango de distribución de sueros falsos positivos según el valor del PP para el ELISAI Svanova

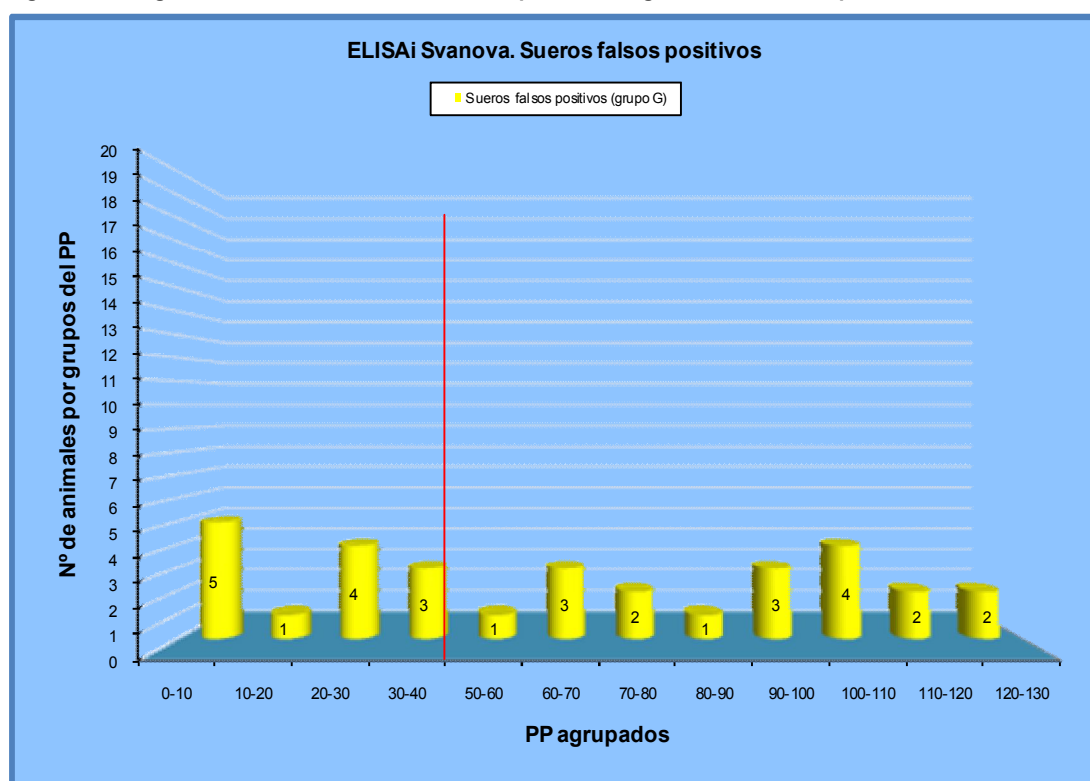


Figura 71. Rango de distribución de sueros falsos positivos según el valor del PP para el ELISAI Idexx

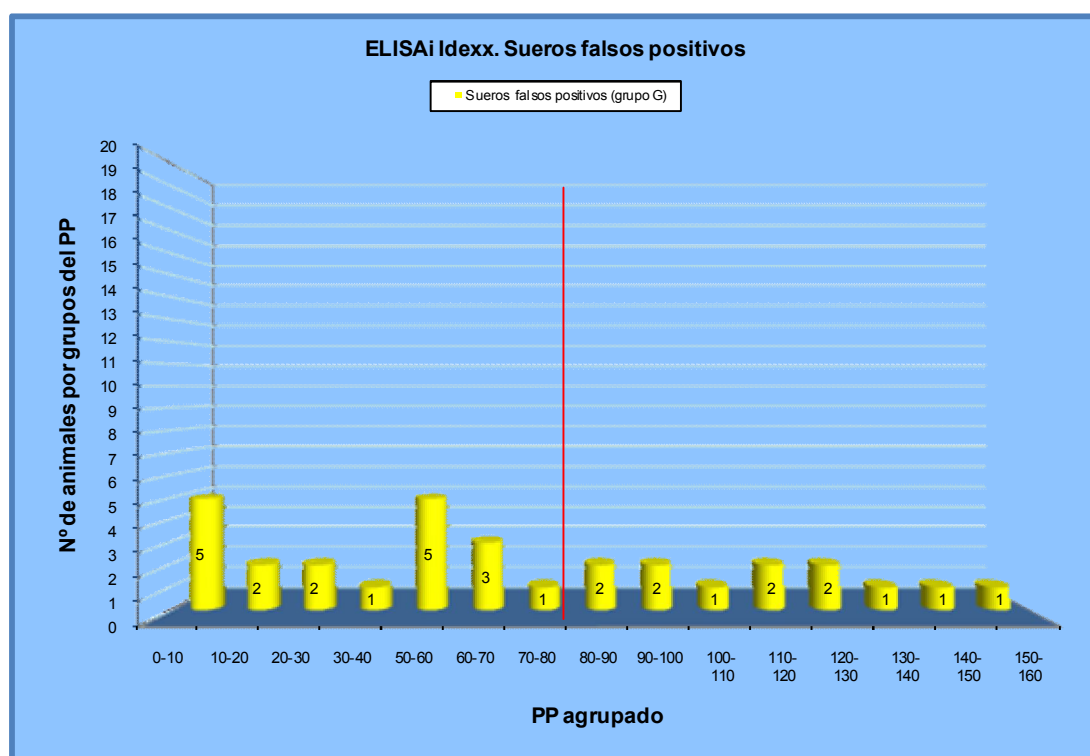


Figura 72. Rango de distribución de sueros falsos positivos según el valor del PI para el ELISAc Svanova

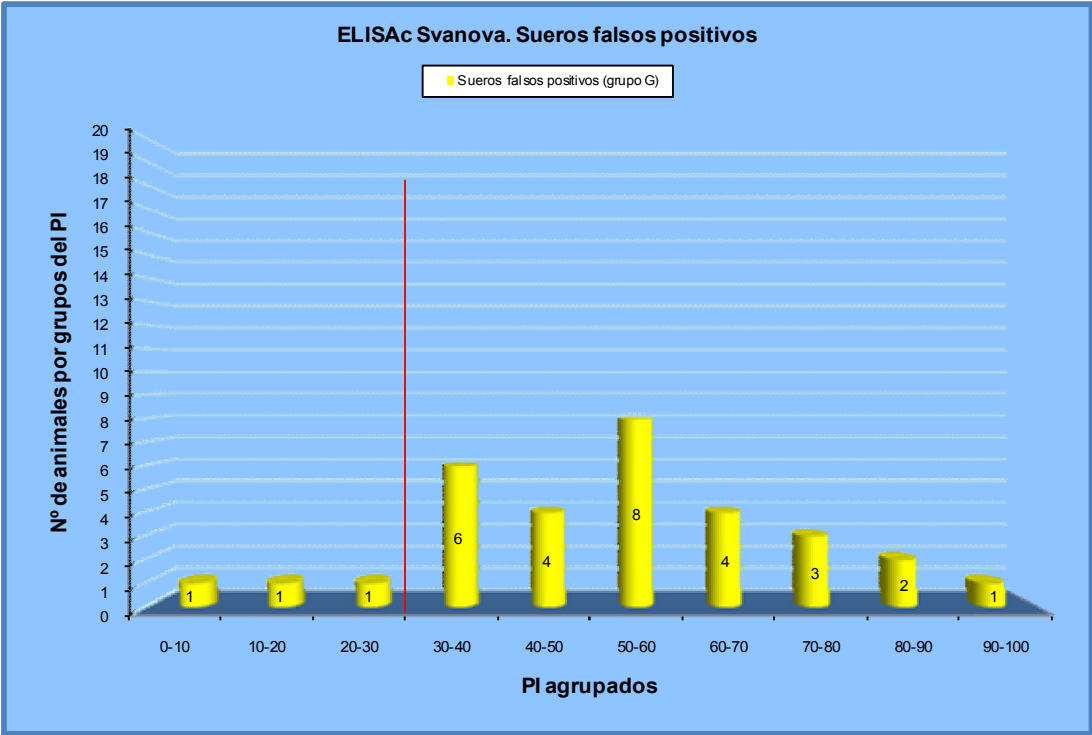
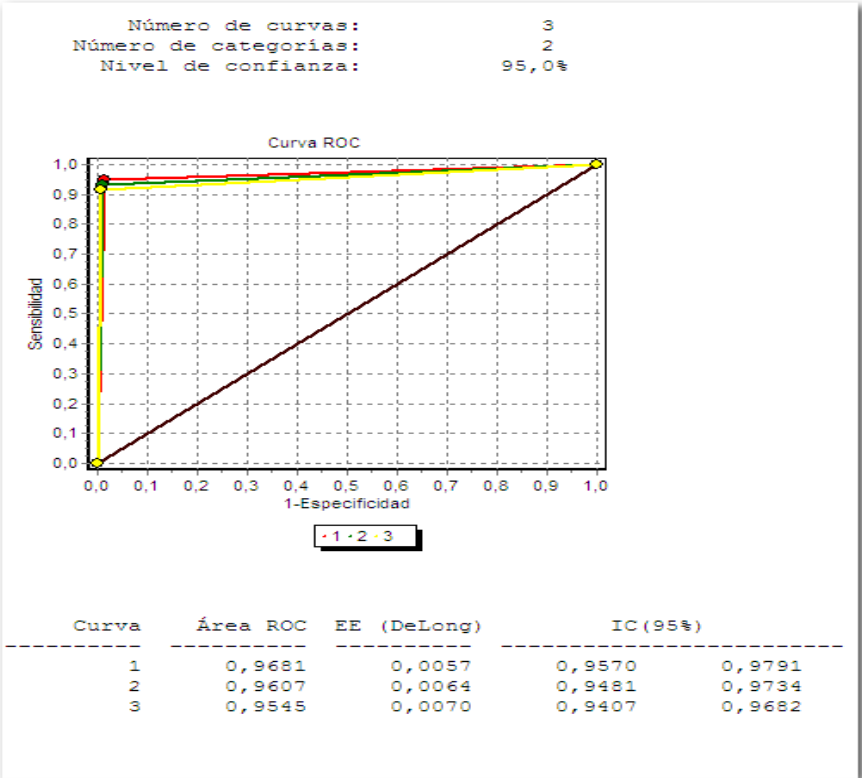
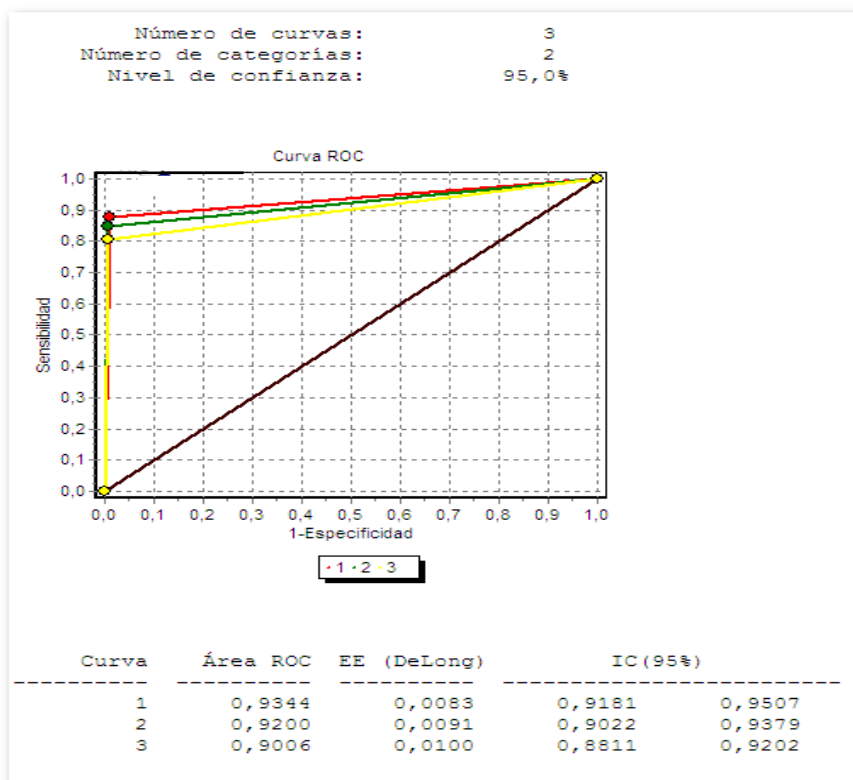


Figura 73. Curvas ROC del ELISAi Svanova para tres COff diferentes en relación a AMRB+FC



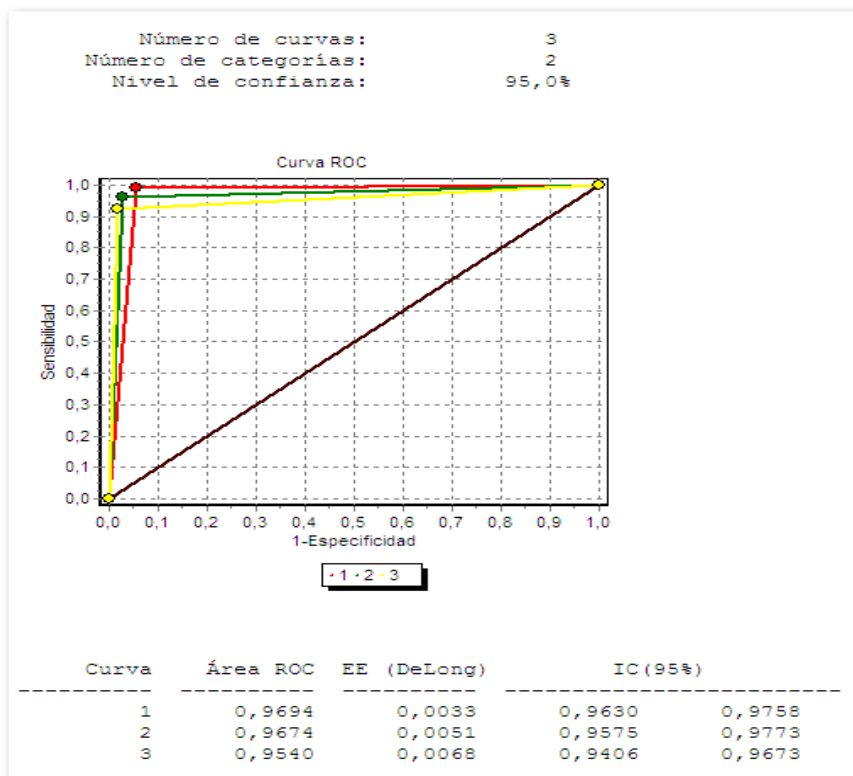
Curva 1: PP 30%, curva 2: PP 40%, curva 3: PP 50 %

Figura 74. Curvas ROC del ELISAi Idexx para tres COff diferentes en relación a AMRB+FC



Curva 1: PP 70%, curva 2: PP 80%, curva 3: PP 90 %

Figura 75. Curvas ROC del ELISAc Svanova para tres COff diferentes en relación a AMRB+FC



Curva 1: PI 20%, curva 2: PI 30%, curva 3: PI 40 %

Tabla 57. Curvas ROC obtenidas para los tres ELISAs para cinco COff diferentes

		CRITERIO ABSOLUTO			CRITERIO RELATIVO		
		AUC	IC 95%		AUC	IC 95%	
<b>Svanova Indirecto</b>	PP 30	<b>0,9799</b>	0,9674	0,9924	<b>0,9681</b>	0,9570	0,9791
	PP 35	<b>0,9713</b>	0,9564	0,9861	<b>0,9637</b>	0,9516	0,9757
	PP 40	<b>0,9713</b>	0,9564	0,9861	<b>0,9607</b>	0,9481	0,9734
	PP 45	<b>0,9694</b>	0,9540	0,9847	<b>0,9576</b>	0,9444	0,9708
	PP 50	<b>0,9696</b>	0,9542	0,9850	<b>0,9545</b>	0,9407	0,9682
<b>Idexx Indirecto</b>	PP 70	<b>0,9605</b>	0,9432	0,9778	<b>0,9344</b>	0,9181	0,9507
	PP 75	<b>0,9521</b>	0,9332	0,9710	<b>0,9234</b>	0,9059	0,9409
	PP 80	<b>0,9478</b>	0,9281	0,9674	<b>0,9200</b>	0,9022	0,9379
	PP 85	<b>0,9308</b>	0,9086	0,9530	<b>0,9118</b>	0,8932	0,9305
	PP 90	<b>0,9243</b>	0,9012	0,9474	<b>0,9006</b>	0,8811	0,9202
<b>Svanova Competición</b>	PI 20	<b>0,9781</b>	0,9681	0,9881	<b>0,9694</b>	0,9630	0,9758
	PI 25	<b>0,9778</b>	0,9657	0,9900	<b>0,9700</b>	0,9616	0,9784
	PI 30	<b>0,9693</b>	0,9547	0,9840	<b>0,9674</b>	0,9575	0,9773
	PI 35	<b>0,9642</b>	0,9480	0,9804	<b>0,9581</b>	0,9458	0,9705
	PI 40	<b>0,9654</b>	0,9492	0,9816	<b>0,9540</b>	0,9406	0,9673

## **V. Discusión**

### **1. La verificación interna de la AMRB y de los ELISAs**

Previo al uso de rutina de cualquier test para diagnóstico, los laboratorios que lo van a utilizar deben garantizar que en sus instalaciones y con sus condiciones particulares el test se comporte según lo esperado. Este fue el objetivo de los procedimientos de verificación interna aplicados a los test utilizados en este estudio, siguiendo las recomendaciones establecidas por la norma UNE-UE ISO/IEC 17025:2005. En términos generales, el rendimiento de un test de diagnóstico puede describirse con cuatro atributos: exactitud, precisión, Se y Sp. La exactitud sería la habilidad de un test para clasificar correctamente las muestras en positivas y negativas, es decir, Se y Sp, y la precisión o repetibilidad, sería la habilidad de un test para producir resultados consistentes con análisis repetidos de las mismas muestras (Gall y Nielsen, 2001). Sin embargo, el concepto de exactitud debe ser matizado en el ámbito de la verificación interna, básicamente en relación al número reducido y a la naturaleza de las muestras necesarias para su estimación. La verificación interna implicaría un procedimiento reducido en el interior del laboratorio de ensayo, en el que podrían ser suficientes entre tres y cinco muestras de valor conocido para la estimación de la exactitud. Esas muestras incluirían obligatoriamente los estándares de referencia disponibles para la enfermedad en cuestión. En el ámbito de la extensión de la validación de un método, la exactitud en términos de Se y Sp implicaría el uso de muchas muestras positivas y negativas y diferentes de los estándares de referencia.

La repetibilidad de un método de ensayo sería una estimación indicativa de la precisión y se expresaría por medio de estadígrafos como la  $M$ , la  $SD$  de la  $M$  o el CV (Jacobson, 1998; Ortiz y cols., 2007). Esta fue la sistemática utilizada para la estimación de la precisión en los test de ELISA, ya que el resultado se obtuvo con valores numéricos. Para la AMRB, en la que el resultado se obtuvo en términos de positivo/negativo, se optó por la estimación del porcentaje de falsos positivos y de falsos negativos intensificando la repetición de muestras con valores próximos al COff del test (Gabinete de Servicios para la Calidad, 2009). Adicionalmente, para ambos tipos de test se estableció una sistemática de control interno que garantizase la repetibilidad intermedia en términos de precisión. Para los ELISAs se utilizaron los gráficos de control y para la AMRB la concordancia entre el resultado obtenido y el esperado de dos muestras, una positiva y otra negativa, de valor conocido. La muestra positiva debería presentar un valor próximo al COff.

En la actualidad la AMRB, en el LASAPAGA, es un ensayo que se ajusta a los requisitos de la norma ISO 17025 y está acreditado por la Entidad Nacional de Acreditación (ENAC). En este estudio se incluyeron y se evaluaron los resultados obtenidos en la verificación interna previa a la acreditación del ensayo. Los resultados incluidos en este trabajo corresponden a los obtenidos en los ensayos realizados con muestras de bovino, prescindiendo de las muestras de otras especies, como

es el caso de los pequeños rumiantes y del porcino, que no guardaban relación con el objeto de este estudio.

Los resultados de la verificación interna indicaron que el comportamiento en términos de falsos positivos y de falsos negativos de la AMRB fue similar al del RB. Ambos test detectaron las mismas muestras positivas y casi siempre a la misma dilución, no apreciándose diferencias en la Se diagnóstica ni en la Se analítica. Las discrepancias con respecto a la última dilución detectada como positiva nunca fueron superiores a una, por lo que hay que asociarlas a la incertidumbre habitual en la realización de un ensayo y no a diferencias intrínsecas de los test. Los resultados obtenidos con las muestras negativas también confirmaron una Sp similar entre ambos test. En relación a la repetibilidad intermedia, los estándares positivos y negativos incluidos en los ensayos de extensión de la validación siempre generaron el resultado esperado positivo/negativo poniendo de manifiesto la repetibilidad de ensayo y la capacidad del laboratorio para obtener los resultados esperados sobre muestras de valor conocido. Con los ensayos interlaboratorio se demostró que la AMRB fue reproducible entre laboratorios y que el LASAPAGA fue capaz de obtener unos resultados semejantes a otros laboratorios con las mismas muestras.

En la verificación de la AMRB no se utilizaron los estándares positivos por duplicado en cada placa, como sería lo habitual. Como consecuencia, en la auditoría realizada por la ENAC se reflejó esta circunstancia y fue necesario completar los ensayos de verificación con otros ensayos que incluyesen muestras duplicadas de estándares positivos en placas diferentes, realizadas en el mismo día y en días diferentes. Sin embargo, cada vez que se realizaron ensayos para la extensión de la validación se incluyeron los estándares positivos correspondientes en todas las placas, obteniéndose resultados satisfactorios en todas ellas. Por tanto, la utilidad práctica de los nuevos estudios con muestras duplicadas fue irrelevante.

Los resultados obtenidos con la AMRB de doble suero, en relación a la AMRB y al RB, mostraron una mayor Se de este test. La explicación a este resultado estaría relacionada con el hecho de que al duplicar el volumen de suero también lo estaría la cantidad de Ac. De esta forma, algunos sueros con niveles bajos de Ac producirían aglutinaciones dispersas no observables a simple vista con la AMRB y con el RB. Sin embargo, la presencia del doble de Ac, manteniendo constantes los otros reactivos, sí produciría aglutinaciones observables y, por tanto, se incrementaría la Se analítica del test. Ahora bien, el uso sistemático de este método probablemente incrementaría el número de falsos positivos al aumentar la intensidad de las reacciones inespecíficas por los mismos motivos, por lo que su utilidad en la práctica sería limitada. Sin embargo, podría ser de utilidad en la investigación de focos confirmados de brucelosis en los que el sacrificio de algún animal falso positivo tendría muy poca relevancia.

El ajuste del suero Abadín para su uso como estándar interno puso de manifiesto la menor Se analítica de la AMRB en relación a los ELISAi ya que detectó como positiva la dilución 1/128 por la 1/2048 detectada por los ELISAi. Sin embargo, el resultado fue solamente una dilución inferior al obtenido con el ELISAc Svanova. Para este test y con este control, la estimación de la precisión en condiciones de repetibilidad intermedia tuvo que expresarse en términos de positivo/negativo motivo

por el que se seleccionó una dilución próxima al COff del test. Sin embargo, la Se analítica de la AMRB con doble suero fue ligeramente inferior a la obtenida con los ELISAI ya que detectó como positiva hasta la dilución 1/1024, motivo que reforzaría la recomendación de uso de este test en focos activos de la enfermedad.

En la verificación de los ELISAs se utilizaron estándares positivos y negativos y muestras de campo positivas y negativas. Aunque la disponibilidad de muestras de campo fue suficiente en número y volumen, no sucedió lo mismo con los estándares positivos, cuya cantidad era limitada. Por esta circunstancia, se elaboraron volúmenes suficientes de dos diluciones del PSNR-Pos, una con resultado positivo y otra con resultado negativo, para su uso tanto en los ELISAI como en el ELISAc Svanova. Para la obtención del PP o del PI esperado con las diluciones de uso recomendadas por el LNR-B, para cada ELISA, se tuvo que recurrir a ajustes matemáticos. Los valores obtenidos solamente pueden considerarse “aproximados” y algunos no resultaron satisfactorios. Así, la dilución 1/100 del PSNR-Pos en el ELISAI Idexx debería ser positiva y superior a 80 y la dilución 1/64 del mismo estándar en el ELISAc Svanova debería ser negativa e inferior a 30. Sin embargo, estas desviaciones no fueron especialmente importantes ya que se situaron prácticamente dentro de los niveles recomendados por el fabricante para cada uno de los test. A su vez, los valores intermedios fueron estimados de forma lineal. Sin embargo, las diluciones seriadas de sueros positivos no siguen una línea recta, sino que describen curvas sigmoideas características para cada tipo de ELISA (Wright y cols., 1993). Por tanto, la posición real de estas diluciones no sería exactamente la estimada de forma matemática, probablemente la dilución 1/64 del PSNR-Pos para el ELISAc Svanova presentaría un valor más bajo y la dilución 1/100 del mismo estándar presentaría un valor más elevado en ambos ELISAI. Por otro lado, aunque ambos ELISAI presentaron una pendiente similar con respecto al PSNR-Pos no siempre ocurre así y, en otros casos, las líneas de unión entre dos puntos siguen pendientes totalmente diferentes tal como describió McGiven y cols. (2008). Cuando se compararon las curvas obtenidas para un mismo ELISA a diferentes COff se pudo observar que pequeñas variaciones de éste producían cambios en el rendimiento del test de distinta intensidad según el ELISA. Por ejemplo, la modificación del COff en el ELISAI Idexx mejoraba de forma importante su comportamiento, al mismo tiempo que mejoraba también la respuesta a las diluciones correspondientes del PSNR-Pos. Sin embargo, para el ELISAI Svanova estos cambios eran mucho menos significativos, aunque la modificación del COff también mejoraba la respuesta frente al estándar de referencia. Para el ELISAc Svanova la disminución del COff empeoraba la detección del PSNR-Pos. Para este test, el comportamiento del estándar débil podría estar relacionado con una falta de armonización de los ELISAc a nivel europeo como se indicó en un estudio realizado por McGiven y cols. (2006), a una preparación inadecuada de las diluciones de uso o a la falta de idoneidad del estándar suministrado por el LNR-B. En relación a este último aspecto para todos los test de ELISA el valor del PSNR-Pos estuvo excesivamente próximo al COff cuando no era necesario. Por ejemplo, para los ELISAI la distancia entre la dilución 1/100 positiva y la dilución 1/450 negativa fue excesivamente grande, ya que la dilución 1/256 era negativa inequívocamente.

Por otro lado, sería recomendable que los test detectasen las mismas diluciones del estándar o, por lo menos, que estuviesen próximas, lo que permitiría una estandarización mucho más adecuada de los test. Una respuesta similar de ambos tipos de ELISAs guardaría relación con una composición de Ac del estándar característica de una respuesta típica a la brucelosis.

McGiven y cols. (2008) publicaron los resultados obtenidos con el análisis de muestras positivas y muestras negativas procedentes de animales con una situación sanitaria conocida y de muestras obtenidas a partir de diluciones del suero estándar fuertemente positivo de la OIE para ELISA (OIEELISAspSS), con dos ELISAi utilizados para el diagnóstico de la brucelosis bovina en Gran Bretaña. En uno de los ELISAs se realizaron modificaciones que pretendían mejorar su comportamiento en relación al otro test. El COff de ambos ELISAs debería situarse entre dos diluciones determinadas del OIEELISAspSS. En relación a los resultados obtenidos para el estándar de referencia se pudo apreciar que aunque los resultados fueron adecuados para ambos ELISAs, en uno de ellos la dilución más baja del estándar fue detectada justo por encima del COff, por lo que pequeñas modificaciones en las condiciones de uso del test originarían cambios en la clasificación del estándar. Como quiera que sea, el PP de la dilución de uso positiva del PSNR-Pos en los ELISAi se situó excesivamente próxima al COff esperado, mientras que la dilución negativa se situó muy alejada de ese mismo COff (dilución 1/100 y 1/450, respectivamente). McGiven y cols. (2006) establecieron que un ELISA bien estandarizado debería detectar adecuadamente las siguientes diluciones de los estándares de referencia: la 1/150 del suero estándar de referencia internacional de la OIE (OIEISS) y la 1/16 del OIEELISAspSS como estándares positivo (alguna de ellas o las dos) y la dilución 1/64 también del OIEELISAspSS como estándar negativo. Con este criterio, un resultado negativo para alguno de los estándares positivos no cuestiona el comportamiento del ELISA, situación que no permite el criterio establecido por el LNR-B con el PSNR-Pos.

El ajuste del suero Abadín como patrón cuaternario tuvo que hacerse mediante una estimación matemática debido a la escasez del PSNR-Pos y a la limitación de los reactivos de ELISA disponibles. Las curvas sigmoideas dosis/respuesta obtenidas con el suero Abadín con ambos tipos de ELISAs fueron comparables a las indicadas por Wright y cols. (1993). En principio este dato indicaría un nivel en Ac próximo al de un suero con una respuesta típica a la brucelosis. Sin embargo, las diluciones detectadas como positivas al ser tan diferentes por los dos tipos de ELISAs sugieren una composición con Ac de diferente avidéz según el test. Es decir, serían las limitaciones particulares con respecto a los isotipos de Ig que detectan los diferentes test utilizados en el diagnóstico de la brucelosis, lo que justificaría el comportamiento particular de cada uno de ellos con las mismas muestras (Wright y cols., 1997). La Se analítica de los ELISAi fue mayor que la del ELISAc Svanova según los resultados obtenidos con las diluciones del suero Abadín. Esta misma circunstancia también se constató al comparar las diluciones de uso recomendadas por el LNR-B para el PSNR-Pos para cada tipo de ELISA. En la misma dirección, McGiven y cols. (2006), a partir de los resultados obtenidos con las mismas diluciones del OIEELISAspSS en ensayos de intercomparación entre laboratorios de referencia europeos para la brucelosis, constataron la menor Se analítica del ELISAc en relación al ELISAi. Sin embargo, no siempre se comportaron de esa forma



ya que con alguno de los otros sueros positivos investigados la dilución detectada por ambos tipos de ELISAs fue la misma. Este hecho ayudaría a comprender la falta de diferencias significativas en los valores estimados de la Se entre los ELISAI y el ELISAc Svanova.

El ajuste de una muestra a un estándar para su uso como nuevo estándar debería realizarse de forma precisa, evitando los ajustes matemáticos. Para ello, es necesario que los laboratorios de referencia sean capaces de suministrar estándares en cantidad suficiente y siempre que sean solicitados por los laboratorios de rutina. Además, esos mismos laboratorios deberían elaborar los protocolos detallados para realizar el ajuste. Sin embargo, en situaciones con limitaciones en la disponibilidad de controles, los ajustes podrían realizarse mediante ajustes matemáticos. El laboratorio de rutina debería disponer de reactivos en cantidad suficiente para realizar los ajustes previos al uso del test, ya que con relativa frecuencia se dan por válidos resultados obtenidos en placas “validadas” exclusivamente según los criterios establecidos por el fabricante. Siguiendo con el fabricante, sería necesario que suministrase una información la más completa posible sobre el comportamiento esperado de los controles del test: valores de DO normalizada, el CV de esos valores y el PP o PI según el tipo de test. Además, deberían aportar la relación de los estándares utilizados en la validación del test y los resultados normalizados obtenidos con estos patrones.

Los gráficos de control (DDD y SDC) se utilizaron para la representación gráfica de la precisión de los test de ELISA en condiciones de repetibilidad intermedia y constituyeron una herramienta excelente para este fin. En los gráficos de este estudio se representaron los valores de la DO bruta o normalizada de determinados controles incluidos en cada placa de ensayo. Según Wright y cols. (1993) estos controles deberían informar si los ensayos se desarrollaron dentro de los límites operativos esperados y, al mismo tiempo, monitorizar la variabilidad dentro y entre ensayos. Estos mismos autores recomendaron la utilización en cada placa de tres controles por cuádruplicado en el ELISAI y de cuatro controles por cuádruplicado en el ELISAc. El modelo de gráfico utilizado en este estudio fue el propuesto por Crowther (2009) que contemplaba la utilización de los controles y de las réplicas recomendadas por Wright y cols. (1993). Sin embargo, en este estudio la disponibilidad de reactivos fue limitada. Esta limitación también sería posible en condiciones reales de trabajo. Con el objetivo de resolverla se elaboró una sistemática de trabajo que garantizase el control de los procesos con un consumo menor de reactivos y de controles. Para ello, en cada placa se incluyeron los controles por duplicado suministrados por el fabricante con la finalidad de validar las placas y obtener el COff. Y además, se incluyeron dos diluciones positivas por individual del suero Abadín, una fuerte y otra débil, para verificar el rango de detección del test en cada placa y para evaluar la precisión en condiciones de repetibilidad intermedia de los ensayos, independientemente de los lotes de reactivos y de las condiciones concretas de uso de cada uno de esos lotes.

La recomendación de Crowther (2009) para la elaboración de los gráficos era que se incluyesen los valores brutos y normalizados de la DO. En relación al control del test se representó solamente el valor bruto de la DO, ya que al ser utilizado para la obtención del COff el valor normalizado siempre sería 100 y carecería de utilidad para el control de los procesos. En el ELISAc la

muestra utilizada para la obtención del COff fue el control del conjugado, pero los resultados que generó fueron similares a los obtenidos con el control negativo, por lo que el PI del control del conjugado siempre estaría próximo a 100 y tampoco aportarían la información necesaria sobre el desarrollo de los procesos. Con respecto al suero Abadín, no se representaron las DO brutas debido a que al no incluir muestras por duplicado los valores individuales fueron excesivamente dispersos y aportaban poca información. Para paliar esta circunstancia se incluyeron los valores normalizados que fueron bastante más estables.

El análisis de los gráficos de control permitió verificar que los test se comportaron según lo esperado tomando como referencia los valores de la  $M$  y de la  $SD$  de la  $M$  de los valores de los controles representados en los gráficos. En alguna de las placas se observó un número reducido de valores por encima de los máximos permitidos y debieron repetirse, tal como aconseja Crowther (2009), pero esta medida no se aplicó a las placas con muestras del grupo de sueros negativos de animales oficialmente indemnes (grupo D) en las que todos los resultados de los ensayos fueron negativos, debido a la limitación de reactivos. Sin embargo, en una situación real, con muestras de campo, las placas deberían repetirse.

En los gráficos de control se observó la superposición de los límites de dispersión de los controles positivos y negativos en el ELISAI Idexx y en el ELISAc Svanova. Precisamente para garantizar en todas las placas la operatividad del rango de detección, se incluyeron controles positivos fuertes y débiles, siguiendo las recomendaciones de Wright y cols. (1993). Una diferencia entre ambos valores fuera del rango esperado significaría, aún en el caso de que la placa se validase según los criterios del fabricante, que alguna otra muestra con valores próximos al COff fuese clasificada de forma inadecuada. Este hecho sería de especial relevancia en el control de focos activos de brucelosis si los test clasificasen a alguno de los animales como falsos negativos. En estos casos, la obtención del COff a partir de controles positivos débiles, como sucede con el ELISAI Idexx, podría presentar ventajas en relación a aquellos test que utilizasen controles de valor elevado, alejados del COff, y expuestos a una mayor variabilidad en términos absolutos. Las elevaciones o descensos en la misma dirección de los valores medios de las dos diluciones del suero Abadín incluidas en las placas también permitieron verificar la estabilidad del rango de detección de positivos.

Los CV de las DO de los controles positivos de los test suministrados por los fabricantes fueron menores del 10% para todos ellos. Sin embargo, los CV de la DO bruta y normalizada del suero Abadín fueron mayores en el ELISA i Svanova y en el ELISAc Svanova que en el ELISAI Idexx. Los equipos, el personal, las condiciones ambientales y las condiciones de almacenamiento en el laboratorio fueron comunes para todos ellos. Sin embargo, mientras que para el ELISAI Idexx si se conocieron en todo momento las temperaturas de almacenamiento del proceso de distribución, desde el fabricante hasta el laboratorio, no sucedió lo mismo con los test de Svanova, lo que no implica que las temperaturas del proceso de distribución fuesen inadecuadas para estos test. Sin embargo, la temperatura de almacenamiento inadecuada está considerada como uno de los factores más críticos para la repetibilidad de un ensayo (Crowther y cols., 2006). De haberse producido, este hecho podría explicar el comportamiento de los test de Svanova en relación al suero Abadín.

Los gráficos SDC marcaron las tendencias de los controles y los gráficos DDD permitieron evaluar a nivel de placa las posibles causas responsables de los cambios de tendencia. En este estudio no se observaron variaciones significativas en la tendencia de los valores y los obtenidos para cada placa se mantuvieron generalmente dentro de lo esperado. La existencia de algunas barras de error por encima de los valores esperados fueron las principales desviaciones detectadas. Sin embargo, en el ELISAI Svanova los resultados de la dilución 1/1600 del suero Abadín estuvieron ligeramente por encima del valor de referencia estimado en la verificación interna, probablemente relacionado con la estimación matemática de ese valor. Por el contrario, para el ELISAc Svanova los valores de la dilución 1/100 del mismo estándar estuvieron por debajo del valor esperado, situación que no se observó con la dilución 1/50. Esta circunstancia sugiere un posible error en la preparación de las diluciones más que problemas intrínsecos del test o asociados a la realización de los ensayos.

Los resultados obtenidos con el PSNR-Pos permitieron verificar la posición del COff en todos los ELISAs. El ELISAI Svanova detectó adecuadamente las dos diluciones del estándar, incluso modificando el COff en función de la situación epidemiológica de la población sobre la que se vaya a aplicar. Este dato reforzó la recomendación de seleccionar este test como el ELISA más adecuado para prueba de cribado. El ELISAc Svanova no detectó adecuadamente la dilución 1/64 del PSNR-Pos que debería presentar un resultado negativo. Además, la modificación del COff propuesta para adecuar el uso de este test a las condiciones sanitarias de Galicia empeoraría el resultado obtenido con este patrón. Tal como indicó McGiven y cols. (2003) sería necesario revisar la armonización de los ELISAc para su uso en el comercio internacional o en la calificación sanitaria de explotaciones. El ELISAI Idexx no detectó adecuadamente la dilución 1/100 del PSNR-Pos, pero el valor obtenido se situó inmediatamente por debajo del COff. Para este test se pudo observar que el descenso del COff mejoraba significativamente su comportamiento en términos de Se y le permitiría detectar adecuadamente la dilución positiva del PSNR-Pos. Sin embargo, esta circunstancia no fue suficiente para justificar su comportamiento con muestras positivas, como se discutirá en los apartados referentes al análisis de los resultados obtenidos en la extensión de la validación.

## **2. Análisis de los grupos de sueros utilizados en la extensión de la validación**

Los valores estimados de los parámetros de rendimiento de un test siempre estuvieron influenciados por las características de los sueros utilizados en la estimación. En la medida en que los sueros fuesen capaces de reproducir la situación epidemiológica de la enfermedad objeto de estudio en la población animal a analizar, mayor será su veracidad y se podrá conocer con más garantías que test o series de test serían más adecuados para su uso en esa población (Mainar y cols., 2005; Muñoz y cols., 2005). Por tanto, el objetivo final de la extensión de la validación de un método de ensayo será evaluar su comportamiento en diferentes poblaciones y cuando se pretenda transferirlo a otras áreas geográficas, o a otras situaciones epidemiológicas, se deberán realizar nuevos estudios de validación con muestras de animales representativos de esas nuevas situaciones (OIE, 2006a). El conjunto de animales seleccionados para la obtención de muestras utilizadas en la validación de un

método de ensayo deberían incluir a la mayoría de los factores inherentes al hospedador que pueden afectar al analizable de la muestra y a aquellos animales en todos los estados de la enfermedad o afectados por enfermedades próximas a la estudiada (Jacobson, 1998).

Los grupos de muestras utilizadas en este estudio pretendieron dar respuesta a las recomendaciones anteriores, incluyendo el mayor número de muestras disponibles y significativas de las situaciones epidemiológicas que se producen en Galicia en relación a la brucelosis, con un énfasis especial en el control de focos activos y en la discriminación de falsos positivos debidos a reacciones cruzadas. No obstante, hubiese sido recomendable disponer de un número de sueros positivos de animales con aislamiento (grupo A) superior a los 232 de este estudio, preferentemente por encima de las 300 (OIE, 2006a). Este incremento permitiría disminuir el porcentaje de error admitido y disminuir el rango estimado del intervalo de confianza del 95%, para la Se (Jacobson, 1998). Con un grupo de muestras mayor, el valor absoluto estimado para este parámetro en el ELISAI Idexx probablemente presentaría diferencias significativas en relación a los valores estimados para los otros ELISAs debido a que el incremento del número de sueros estándar procedentes de animales con infección conocida reduce el error en la estimación (OIE, 2006a). El número de muestras con aislamiento positivo utilizadas en los estudios incluidos en la bibliografía osciló entre las 60 utilizadas por McGiven y cols. (2008) hasta las 654 utilizadas por Nielsen y cols. (1996), siendo la cantidad más frecuente alrededor de las 200: McGiven y cols. (2003) utilizaron 146 muestras, Dohoo y cols. (1986) utilizaron 174 muestras, Nielsen y cols. (2007) utilizaron 238, Rojas y Alonso (1995) utilizaron 244 muestras o Portanti y cols. (2006) utilizaron 265 muestras.

Por tanto, una de las principales limitaciones para la estimación del rendimiento de test de diagnóstico en brucelosis siempre fue la dificultad para disponer de muestras con aislamiento positivo (McGiven y cols., 2003). En las muestras de este estudio se incluyeron dos grupos sueros positivos: sueros positivos de animales con aislamiento (grupo A) y sueros positivos de animales sin aislamiento (grupo C). El primer grupo se utilizó para el criterio absoluto de comparación ya que los animales se clasificaron como positivos por la técnica “gold standar” del aislamiento en medios selectivos. Esta técnica se caracteriza por su baja Se, lo que impide la disposición de muestras positivas en todos los estadios de la enfermedad (Gall y Nielsen, 2004). Esta circunstancia se traduce en sesgos cuando las muestras se utilizan para la estimación de la Se de los test serológicos (OIE, 2006a). La baja Se del aislamiento afectó a la clasificación de los sueros incluidos en el grupo C ya que procedían de animales sobre los que no se pudo obtener un aislamiento positivo y, sin embargo, existían pocas dudas en relación a que no fuesen verdaderamente positivos. Para este grupo, además de la Se limitada inherente al test, hubo que añadir la asociada a la sistemática utilizada para la obtención de muestras en las CSG en Galicia. En esta CA el objetivo del aislamiento siempre fue la identificación del microorganismo en el foco y no el aislamiento sistemático del microorganismo en los animales. Por eso, las muestras seleccionadas en los animales sacrificados fueron limitadas, al igual que el número de los que se obtenían muestras. En muchas ocasiones, una vez aislado el microorganismo ya no se continuaba con los análisis de otras muestras del mismo foco. A pesar de ello, los resultados a FC indicaron una gran diversidad de animales positivos en relación al título de Ac, lo que indicaría la

presencia de animales en estadios diferentes de la enfermedad. A pesar de la baja Se del aislamiento cabe destacar la presencia de sueros procedentes de animales con aislamiento positivo que, sin embargo, no fueron detectados por los test de diagnóstico serológicos. Probablemente esta circunstancia estaría relacionada con el hecho de que estos animales procedían de vacíos sanitarios en los que su sacrificio no se originó por la detección de Ac específicos en ellos, sino como consecuencia de una medida sanitaria para el control del foco. Estos aspectos fueron importantes para explicar el comportamiento de los test de ELISA y las posibles recomendaciones de uso. A pesar de las limitaciones señaladas, en este estudio se utilizaron 232 muestras con aislamiento positivo (grupo A), que se elevaron hasta las 340 al añadir las muestras positivas de animales sin aislamiento (grupo C), cifra bastante superior a las utilizadas en la mayoría de la bibliografía citada.

El número de muestras negativas procedentes de animales oficialmente indemnes (grupo D) fue de 2.107, muy superiores a las 1.000 recomendadas para la validación de métodos de ensayo por la OIE (OIE, 2006a).

El grupo de sueros utilizado en la extensión de la validación no presentaba Ac frente a vacunas debido a que esta práctica está prohibida en Galicia desde el año 1990 (Díaz Cano y cols., 1997). Como es sabido estos Ac constituyen uno de los factores que más interfiere en el comportamiento de un test de diagnóstico, pero que carece de interés en esta CA. Sin embargo, su efecto se ha evaluado en diversas publicaciones debido a que las vacunas se siguen utilizando en muchas partes del mundo para el control de la brucelosis en ganado vacuno (Dohoo y cols., 1986; Nielsen y cols., 1995; Nielsen y cols., 2007; Rojas y Alonso, 1995).

Para evaluar el comportamiento de los test en focos activos de brucelosis y en sospechas de reacciones cruzadas con otros microorganismos se incluyeron grupos de muestras característicos de estas situaciones epidemiológicas. Además de los dos grupos utilizados para la estimación absoluta de los parámetros de rendimiento (grupo A y grupo D), para el estudio de focos activos de brucelosis se incluyeron los siguientes grupos: sueros de animales con conversión del título de Ac (grupo B), sueros positivos de animales sin aislamiento (grupo C) y sueros negativos acompañantes de infectados (grupo E). Para el estudio de las reacciones cruzadas originadas por microorganismos afines se incluyeron los sueros falsos positivos (grupo G). Adicionalmente se incluyó el grupo de sueros con PA (grupo F) ya que este resultado de la FC es de difícil interpretación, sobre todo teniendo en cuenta que esta técnica sigue siendo la prueba de confirmación más utilizada en la UE.

Las muestras de los grupos anteriores no pudieron caracterizarse con las pruebas “gold estándar”. Resultó evidente la imposibilidad de estudiar por la técnica del aislamiento a todos los animales de los que se obtuvieron muestras y que además no pertenecían a explotaciones oficialmente indemnes, por lo que para su clasificación se tuvo que recurrir a un estándar relativo de comparación. Para este fin, los test utilizados fueron los habituales en la CSG: AMRB y FC, en serie. Cuando solo se dispone de estándares relativos, el error previo cometido con ellos se va a transmitir a la evaluación del nuevo ensayo (OIE, 2006a). Sin embargo, el uso de estas muestras permitió evaluar si los ELISAs originarían o no variaciones significativas en la prevalencia de la enfermedad si se utilizasen en la población de Galicia, al mismo tiempo que se podría evaluar si los mismos test

presentarían ventajas diagnósticas en relación a la situación epidemiológica de determinados animales en esa misma población.

Los programas sanitarios de control de la brucelosis en España se basan en pruebas de detección de animales positivos y sacrificio obligatorio de los mismos, estando prohibida la utilización de tratamientos y la profilaxis con vacunas frente a la enfermedad salvo determinadas excepciones. También se contempló, entre otras medidas, la intensificación de las pruebas diagnósticas para elevar a la mayor brevedad posible la calificación sanitaria de las explotaciones (MARM, 2009). Por tanto, ante la aparición de un foco de brucelosis debe priorizarse la detección precoz de animales positivos para sacrificio, independientemente del estadio que presenten de la enfermedad. Obviamente, este tipo de medidas originan el sacrificio de animales falsos positivos, circunstancia de escasa relevancia en focos activos y en áreas próximas a la erradicación, como es el caso de Galicia. En base a lo anteriormente expuesto, se puede deducir que los grupos de muestras seleccionadas para evaluar el comportamiento de los test en focos confirmados de la enfermedad parecen adecuadas.

Actualmente los principales problemas que presenta el control de la brucelosis en Galicia están relacionados con la detección temprana de focos, con la eliminación rápida de los focos detectados y con la aparición de reacciones cruzadas con otros microorganismos próximos a *Brucella* spp. Esta última situación no tiene todavía una importancia excesivamente relevante, pero cada vez aparecen con más frecuencia casos de difícil interpretación serológica. Por otro lado, una alta proporción de falsas reacciones positivas debidas a *Yersinia enterocolitica* O:9 han surgido en la UE desde 1990, afectando hasta un 15% de los rebaños en las regiones libres de brucelosis (Muñoz y cols., 2005).

Existen numerosos microorganismos responsables de reacciones cruzadas con *Brucella* spp. originadas por la existencia de Ag compartidos entre ellos. Este tipo de reacciones se hacen más evidentes en las fases finales de los programas de erradicación o en zonas libres de brucelosis, en las que llegan a constituir el principal problema para el diagnóstico de la enfermedad (Pouillot y cols., 1998). Existen diferentes microorganismos que comparten la estructura del LPS-S con *Brucella* spp. Entre los más importantes cabe citar a *Vibrio cholerae* O1, *Escherichia coli* O157:H7, algunas cepas de *Escherichia hermannii*, y *Stenotrophomonas maltophilia*, *Salmonella* group N (O:30) y *Yersinia enterocolitica* O:9, pero solo esta última tiene importancia en relación con las falsas reacciones positivas con los test de diagnóstico de brucelosis (Weynants y cols., 1996; Pouillot y cols., 1998; Saegerman y cols., 2004; Muñoz y cols., 2005). *Escherichia coli* O157:H7 ha sido aislada en terneros en Galicia (Blanco y cols., 1988), pero las reacciones serológicas cruzadas detectadas con los test de ELISAI y de ELISAc de brucelosis fueron muy limitadas (Nielsen y cols., 2004). En el LASAPAGA, durante la realización de las CSG, se investigó la posible existencia de *Yersinia enterocolitica* O:9 en heces procedentes de animales que presentaban reacciones serológicas cruzadas con los test de diagnóstico de brucelosis, pero no se consiguió aislar en ningún caso (datos propios no publicados), aunque este tipo de aislamiento tiene una baja Se y la excreción del microorganismo es variable (Pouillot y cols., 1998). Sin embargo, no se realizaron análisis sobre las heces de cerdos destinados a autoconsumo que convivían en las mismas explotaciones de las que se obtuvieron las muestras de

vacuno con reacciones cruzadas, cuando la presencia de este microorganismo es frecuente en los ambientes con cerdos (Nielsen y cols., 2004). Por tanto, fueron los criterios epidemiológicos y los resultados obtenidos con la AMRB+FC las únicas herramientas disponibles para clasificar a los sueros del grupo G como falsos positivos. A pesar de la falta de confirmación de *Yersinia enterocolitica* O:9 en estos animales el análisis de estos sueros con los test resultaron imprescindibles para los objetivos de este estudio.

Precisamente, con el objetivo de disponer de muestras biológicas de valor conocido, en el año 2007 se inició la creación de la Red Nacional de Bancos de Muestras de Sanidad Animal (RedBNM) auspiciada por el Laboratorio Nacional de Referencia de Algete, dependiente del MARM, y varios laboratorios de sanidad animal dependientes de las CCAA de Asturias, Castilla y León, Cataluña, Galicia, Madrid y Valencia. La RedBNM tiene como objetivos la realización de ensayos interlaboratorio entre los laboratorios de las CCAA y los laboratorios nacionales de referencia, el establecimiento de los procesos necesarios para la implantación de los sistemas de la calidad en los laboratorios, el desarrollo, puesta en marcha y validación de métodos de ensayo, y la elaboración de materiales de referencia. Desde luego, la RedBNM parece el mecanismo idóneo para la elaboración de paneles de muestras positivas y negativas a nivel nacional para la validación de métodos de ensayo y para la extensión de la validación de métodos de ensayo en el ámbito territorial de España. Independientemente de que contemplen todos los parámetros que puedan afectar al rendimiento de un test de diagnóstico, resulta evidente que el análisis de las mismas muestras con los mismos test permitiría conocer de forma mucho más exhaustiva su comportamiento y con la salvedad de que siempre se podrían incorporar al banco nuevas muestras o sustituir a alguna de las existentes debido, por ejemplo, a su agotamiento.

### **3. *Análisis de los resultados obtenidos en la extensión de la validación con la AMRB y los ELISAs aplicando el criterio de comparación absoluto***

Inicialmente se estimaron los parámetros de rendimiento de los test aplicando un criterio de comparación absoluto para evidenciar la posible existencia de diferencias significativas entre ellos. La existencia de estas diferencias podría descartar a alguno de ellos para diagnóstico. Se estimaron los principales parámetros de rendimiento utilizados para los test de diagnóstico si bien alguno de ellos no se utilizaron en el ámbito del diagnóstico veterinario, como el índice de Younden, y otros lo fueron con escasa frecuencia, caso de la RV.

En general, los parámetros de rendimiento obtenidos para cada test individualmente fueron excelentes. Cuando se compararon entre ellos se encontraron algunas diferencias importantes que serán discutidas a continuación si bien el índice *Kappa* obtenido para todos los test en relación al aislamiento indicó un grado de acuerdo entre ellos “casi perfecto” y siempre por encima de 0,92.

Los parámetros de rendimiento más importantes para evaluar el comportamiento de un test de diagnóstico siguen siendo la Se y la Sp. Los valores obtenidos en este trabajo fueron comparados con los obtenidos por Gall y Nielsen (2004). Los resultados de estos autores se obtuvieron a partir de los datos de más de 50 publicaciones científicas que incluían a los principales test utilizados en el

diagnóstico de la brucelosis y que les permitieron estimar la Se y la Sp media y el RI, como suma de la Se y de la Sp estimadas inicialmente, para cada test. La Se diagnóstica obtenida en este estudio no evidenció diferencias significativas entre los test, aunque la del ELISAI Idexx fue claramente inferior a la de los otros. Sin embargo, los valores obtenidos para los ELISAs fueron inferiores a los obtenidos por Gall y Nielsen (2004). Este hecho estaría relacionado con la obtención de los sueros de animales con aislamiento positivo a partir de vacíos sanitarios, en los que una parte de los animales no fueron sometidos a pruebas serológicas antes del sacrificio, pero convivieron con animales positivos y en ambientes contaminados, por lo que podría tratarse de animales recién infectados, pero en los que todavía no se habían desarrollado Ac detectables. Sin embargo, los valores obtenidos para la Sp fueron claramente superiores a los obtenidos por Gall y Nielsen (2004) y superior al 99% para todos los test. Si bien, para este parámetro se observaron diferencias significativas con el ELISAc Svanova. Para este test, también se observaron diferencias significativas para el VPP. Los valores de ambos parámetros cuestionaron el uso del ELISAc Svanova como prueba de confirmación.

La Se y la Sp obtenidas para los test clásicos del RB (o AMRB) y de la FC fueron claramente superiores a los obtenidos por Gall y Nielsen (2004). El RI obtenido por estos autores para la RB fue de 167,6 y para la FC de 172,5 mientras que en este estudio los valores del RI fueron de 194,93 para la AMRB y de 193,10 para la AMRB+FC con el criterio de comparación absoluto y no se evaluaron los parámetros de rendimiento de la FC individualmente debido al elevado número de sueros con PA (en el grupo de sueros negativos de animales oficialmente indemnes se detectaron 24 sueros con este resultado). Desde el año 2000 se vinieron realizando ensayos interlaboratorio entre los LNR-B de la UE con el objetivo de evaluar el grado de armonización entre ellos en relación a los principales test utilizados en el diagnóstico de la brucelosis (McGiven y cols., 2006). Los resultados publicados del ensayo del 2003 ponían de manifiesto limitaciones en la armonización del RB basadas en la dificultad de los laboratorios para clasificar correctamente las diluciones en el límite de positividad del suero OIEISS. Los motivos de estas limitaciones se relacionaban con la dificultad en la lectura de los resultados con muestras límite y con la estandarización de los Ag utilizados en la prueba. Sin embargo, los laboratorios fueron capaces de clasificar adecuadamente las muestras procedentes de animales infectados y no infectados. Aunque para la FC se obtuvo un buen nivel de armonización, los laboratorios también tuvieron problemas para la clasificación correcta de las muestras en el límite de positividad, pero no tantas como con el RB. A pesar de todo, en el año 2003 se observaron avances importantes en relación a los resultados obtenidos en los años anteriores. Por tanto, el incremento del RI obtenido en este estudio, comparado con el obtenido por Gall y Nielsen (2004), bien podría estar relacionados con los esfuerzos de estandarización y armonización realizados por el LNR-B de España y el resto de laboratorios de las CCAA. Efectivamente, para la AMRB se obtuvieron unos valores de Se y de Sp absolutos muy elevados y al nivel de los obtenidos para los test de ELISA. Uno de los factores que más pudo contribuir al excelente comportamiento de la AMRB fue la facilidad de lectura de las muestras en el límite de positividad y a la homogeneidad de los reactivos. En relación a la FC se pudo observar que utilizada en serie mejoraba la Sp de la AMRB, pero empeoraba su Se, aunque el descenso no fue significativo. La AMRB detectó como positivas 5 muestras que fueron



clasificadas como negativas por la FC. De éstas, 4 presentaron valores de 15 UIFC. Este resultado fue claramente incierto ya que muestras analizadas a la misma dilución se consideraron positivas o negativas en base al grado de hemólisis de la reacción (dilución del suero 1/4, con 15, 20 o 25 UIFC). Por tanto, las muestras cuyos resultados fuesen similares a los indicados anteriormente, en condiciones de campo, deberían ser analizadas nuevamente para su confirmación, sobre todo teniendo en cuenta la propia incertidumbre asociada a los resultados de la FC de +/- un título.

Para la valoración global de los test se utilizaron dos índices: el índice de validez, concordancia o eficiencia y el RI. Los valores elevados de estos índices pusieron de manifiesto la elevada Se y Sp de los test. Sin embargo, cuando se compararon ambos el índice de validez no presentaba diferencias significativas entre los test y era muy similar para todos ellos. Con el RI, aunque no fue significativamente diferente entre ellos, el valor para el ELISAI Idexx fue bastante más bajo que el obtenido para los otros test, que además presentaron valores muy similares. Con estos resultados, el RI reflejaría de una manera más adecuada el comportamiento de los test, ya que el ELISAI Idexx presentó una Se diagnóstica claramente inferior a los ELISAs.

El ELISAI Idexx fue el que presentó la menor AUC en las curvas ROC debido a su menor Se. En principio se podría pensar que este test necesitaría el establecimiento de un nuevo COff, ya que el AUC se incrementó a medida que descendió éste. Sin embargo, en los estudios de verificación se observó que el test detectó adecuadamente las diluciones del PSNR-Pos y que la representación gráfica de esos valores siguió un patrón similar al obtenido con el ELISAI Svanova. El peor comportamiento de este test también se puso de manifiesto cuando se estimó la Se relativa, por lo que se sugiere la posible existencia de problemas de afinidad entre los Ac de *Brucella* spp. y el anti-Ac conjugado utilizado para el revelado. Aunque no existieron diferencias significativas entre los test en relación a la Se absoluta, los demás test se comportaron mejor que el ELISAI Idexx. En conclusión, este test no debería ser utilizado ni como test de cribado para la calificación sanitaria de explotaciones ni para el control del movimiento pecuario en áreas en las que esté presente la enfermedad. En estos casos, se deberían utilizar los test de mayor Se. Está demostrado que el movimiento pecuario constituye la principal causa de la reintroducción de la enfermedad en áreas libres. En Gran Bretaña se ha desarrollado un modelo de estimación del riesgo de introducción de animales infectados de brucelosis procedentes de Irlanda en el que la Se de los test utilizados para la clasificación de una explotación como oficialmente libre de brucelosis fue el factor que más contribuyó a ese riesgo (Jones y cols., 2004).

En la Orden ARM/2166/2009 se incluyeron las condiciones de uso del ELISAc en el control de la brucelosis en España estableciendo que no se podrá utilizar para certificación en el comercio internacional, pero indicando que se podrá utilizar para corroborar la interpretación de los resultados de otra prueba serológica, especialmente cuando no pueda excluirse una reacción cruzada o la presencia de Ac como respuesta a una vacunación. En Gran Bretaña el ELISAc se utilizará para confirmar los resultados positivos obtenidos previamente por un ELISAI, siempre que las muestras no fuesen adecuadas para FC y/o seroaglutinación en tubo (McGiven y cols., 2008). Los resultados obtenidos en este estudio indicaron que el ELISAc Svanova tuvo una Sp significativamente menor

que los dos ELISAi y su VPP+ también fue significativamente menor que el obtenido para esos mismos ELISAs. Por todo ello, el ELISAc Svanova no parece un test adecuado para la confirmación de los resultados positivos obtenidos con otras pruebas. Sin embargo, el ELISAc Svanova no presentó diferencias significativas en relación a la AMRB, por lo que su utilización en muestras alteradas físicamente y no adecuadas para ser analizadas con los test clásicos, si sería recomendable.

#### **4. Análisis de los resultados obtenidos en la extensión de la validación con los ELISAs utilizando el criterio de comparación relativo y recomendaciones de uso de esos test en diferentes situaciones epidemiológicas en relación a la brucelosis bovina**

No se encontraron publicaciones que incluyesen los parámetros de rendimiento relativo de test de ELISA en relación a la AMRB. Tampoco se encontraron publicaciones con los parámetros de rendimiento de la AMRB en situaciones epidemiológicas similares a la de la brucelosis en Galicia. En la bibliografía utilizada para este estudio, la estimación de los parámetros de rendimiento relativos de los test de ELISA incluyó, en la práctica totalidad de los casos, sueros procedentes de animales vacunados. Cuando se utilizaron estos sueros se evidenció una importante pérdida de Sp en los test. Además, estas estimaciones unas veces incluyeron a todos los sueros del estudio y en otras se obtuvieron diferenciadas para cada uno de los grupos de sueros utilizados. En la población de Galicia no se conoce la existencia de Ac procedentes de vacunas ya que está prohibido su uso desde 1990 (Díaz y cols., 1997). Por tanto, los datos obtenidos de animales vacunados carecían de interés a la hora de evaluar el comportamiento de los test. Por otro lado, los test de comparación no fueron siempre los mismos, aunque en todos los estudios figuró la FC, bien sola o acompañada de otro test de aglutinación. En algunos estudios, se recurrió a la utilización de sueros obtenidos de animales infectados experimentalmente con microorganismos responsables de reacciones cruzadas con *Brucella* spp., principalmente *Yersinia enterocolitica*. Por consiguiente, fue difícil establecer una relación entre los parámetros de rendimiento relativos obtenidos por otros autores y los obtenidos en este estudio.

Finalmente, los parámetros de rendimiento relativos de este estudio se compararon con los obtenidos en un estudio realizado en cuatro países de Sudamérica (Argentina, Chile, Colombia y Costa Rica) y en Canadá por Gall y cols. (1998). Se seleccionó este estudio porque incluía los valores medios obtenidos entre los cuatro países sudamericanos con un número de muestras totales muy elevado, porque los ensayos de comparación utilizados fueron el RB y la FC utilizados según los criterios de cada país y porque incluía la valoración de dos ELISAi y de dos ELISAc. Del trabajo de estos autores se seleccionaron los resultados obtenidos por los dos ELISAi, porque utilizaban un LPS-S como Ag y uno de los ELISAc que además de utilizar el mismo LPS-S, también utilizó el M84 como Ac competidor. Por tanto, los test fueron similares a los utilizados en este estudio. La principal diferencia estuvo en que la población de sueros sudamericanos incluía muestras procedentes de animales vacunados, pero que, sin embargo, no fueron utilizados para la obtención de los valores de

los parámetros de rendimiento utilizados en la comparación. Los resultados de la Se y Sp relativa obtenidos en el estudio sudamericano se incluyeron en la tabla 58.

**Tabla 58. Se y Sp relativa combinada obtenida por Gall y cols. (1998)**

	Se %	Sp %
ELISAI 1	96,77	93,57
ELISAI 2	96,28	97,01
ELISAc	97,47	98,32

Los valores relativos de la Se obtenidos por Gall y cols. (1998), fueron superiores a los obtenidos en este estudio para todos los ELISAs, siendo especialmente más bajo el valor

obtenido para el ELISAI Idexx del 84,77%. A diferencia del valor de la Se absoluta, el de la Se relativa del ELISAI Idexx fue significativamente menor que el obtenido para los otros test y, aunque su utilización en la población de Galicia no afectaría significativamente a la prevalencia de la brucelosis, su uso quedaría totalmente descartado como test de cribado. Sin embargo, cabe destacar el valor elevado de la Se relativa del ELISAc Svanova del 96,40%, en relación al de los ELISAI, si bien el análisis pormenorizado de estos resultados se presentará posteriormente.

Los valores obtenidos en este estudio de la Sp relativa para los ELISAI fueron superiores y el del ELISAc ligeramente inferior a los obtenidos por Gall y cols. (1998).

En conjunto, el ELISAc Svanova fue el que se comportó de manera más similar a la AMRB+FC según el RI. Sin embargo, el VPP y la Sp fueron significativamente inferiores a los obtenidos para los ELISAI, lo que cuestionaría su uso como test de confirmación, como ya se observó con los parámetros de rendimiento absolutos.

La AUC obtenida con las curvas ROC para el ELISAI Idexx fue significativamente menor que la de los otros ELISAs. En los ensayos de verificación interna se puso de manifiesto que el descenso del COff mejoraba los parámetros de rendimiento del este test junto con la detección adecuada del PSNR-Pos. Con el criterio de comparación relativo se observó el mismo comportamiento. Es decir, cuando descendía el COff mejoraba en gran medida la Se relativa del test y el AUC de las curvas ROC. Por lo tanto, la explicación más probable sería una falta de afinidad del anti-Ac conjugado utilizado para la detección.

La AUC obtenida para los ELISAI Svanova y para el ELISAc Svanova fue superior a 0,95 correspondiendo el valor más elevado para este último. Estos resultados fueron similares a los obtenidos por otros autores con valores siempre superiores a 0,95: Francia y cols. (2006), Gall y cols. (1998) y Sanmartino y cols. (1998 y 1999). La dificultad de los test para diferenciar claramente positivos y negativos explicaría la necesidad de establecer COff diferentes para los mismos ELISAs en función de la población estudiada (Gall y cols., 1998), siendo las curvas ROC la herramienta más utilizada para su establecimiento. El análisis de la curva ROC para el ELISAc Svanova permitió comprobar que las modificaciones del COff generaban comportamientos opuestos en la Se y en la Sp. Es decir, el descenso originaba un incremento de la Se, pero una disminución de la Sp y la elevación producía el efecto contrario, incremento de la Sp y disminución de la Se. Esta circunstancia fue utilizada posteriormente para establecer las recomendaciones de uso de este test. La AUC para el ELISAI Svanova fue inferior a la obtenida para el ELISAc Svanova. Para este ELISAI las modificaciones del COff generarían cambios mínimos en la Se y en la Sp, por lo que el rendimiento

del test sería similar independientemente de la situación epidemiológica sobre la que se aplique. Por tanto, globalmente sería el más recomendable de los ELISAs estudiados para usar como test de cribado.

Los valores del índice *Kappa* obtenidos por otros autores indicaron un grado de acuerdo muy elevado entre los diferentes test utilizados en el diagnóstico de la brucelosis. Dependiendo de los test comparados y de la inclusión o no para su estimación de animales vacunados o no vacunados, los valores obtenidos fueron en la inmensa mayoría de los casos superiores a 0,8: Dájer-Abimerhi y cols. (1995), Francia y cols. (2006), Gall y cols. (1998), Moreno y cols. (1998), Pérez y Rojas (1998), Portanti y cols. (2006) y Sanmartino y cols. (1998). Los valores del índice *Kappa* obtenidos en este estudio también fueron superiores a ese valor, lo que indicó que el grado de acuerdo entre los test fue “casi perfecto”. Como era de esperar, los valores obtenidos con el criterio de comparación absoluto fueron superiores a los obtenidos con el criterio de comparación relativo. Los valores del índice *Kappa* más elevados con ambos criterios correspondieron al ELISAi Svanova, lo que ratifica su recomendación de uso como test de cribado por delante de los otros ELISAs. El descenso de los valores del índice *Kappa* obtenidos con el criterio de comparación relativo pusieron de manifiesto la incertidumbre añadida por la AMRB+FC al utilizarse como test de comparación, ya que trasladó sus propias limitaciones a las valoraciones de los test objeto de comparación. Y tal como indica Jacobson (1998), esta circunstancia constituiría la principal limitación de este modelo de estimación de rendimiento de los test de diagnóstico.

En la extensión de la validación se incluyeron grupos de muestras representativas de las situaciones epidemiológicas habituales durante la realización de la CSG. El estudio de los resultados obtenidos permitió explicar alguna de las diferencias observadas entre los parámetros de rendimiento de los test y valorar las ventajas particulares que alguno de ellos en determinadas situaciones epidemiológicas.

Con los sueros positivos de animales con aislamiento (grupo A) se puso de manifiesto que el porcentaje de muestras no detectadas por los test serológicos fue elevado (alrededor del 5%). El número de muestras no detectadas por el ELISAi Idexx fue el doble que para los otros test. El valor de la Se relativa para este test fue significativamente menor que la obtenida para los otros ELISAs. En ocasiones, los test presentaron comportamientos contradictorios entre ellos con algunas muestras (dos muestras no fueron detectadas como positivas por la AMRB, pero sí por los ELISAs) y con otras los resultados de todos los test fueron los contrarios a los esperados (tres muestras no fueron detectadas positivas por ninguno de los test). En la práctica, este hecho indicó que una vez detectado un foco de brucelosis, ningún test fue capaz de detectar a todos los animales positivos, por lo que los animales con resultados negativos a los test de cribado, deberían investigarse por otros test con el objetivo de detectar el mayor número posible de positivos en el menor tiempo posible. Cuando se usó la AMRB en las CSG, los resultados positivos siempre fueron confirmados por FC, pero en este estudio cinco sueros positivos a AMRB no fueron detectados por el test de confirmación, lo que podría cuestionar su uso como técnica de confirmación en focos activos de brucelosis. Esta

circunstancia fue puesta de manifiesto anteriormente por otros autores. McGiven y cols. (2003) observaron diferencias significativas en la detección de muestras con aislamiento positivo entre la FC y un ELISAI a favor de este último. Otro aspecto importante fue el hecho de que algunas muestras con títulos muy elevados a FC fueron positivas en el límite de detección de los ELISAI. Esta circunstancia no se produjo con el ELISAc Svanova en el que todas las muestras con título elevado a FC fueron detectadas con unos PI muy alejados del COff. Este dato debería tenerse en cuenta a la hora de evaluar los resultados negativos a un ELISAI en muestras procedentes de focos activos de brucelosis y con valores de la DO próximos al COff del test. Si para este uso se recurre al ELISAI parece recomendable que los sueros sean investigados por duplicado.

Los resultados obtenidos por la FC con las muestras de la primera extracción del grupo de sueros de animales con conversión del título de Ac (grupo B) volvieron a cuestionar su idoneidad como prueba de confirmación ya que de las dos muestras clasificadas como positivas por la AMRB, una fue clasificada negativa por la FC y otra lo fue con PA, que constituye otro de las limitaciones importantes de este test, tal como indicaron McGiven y cols., (2003). Los resultados obtenidos con las muestras de la segunda extracción volvieron a poner de manifiesto la incapacidad del ELISAI Idexx para detectar muestras positivas. El ELISAc Svanova fue capaz de detectar un mayor número de muestras positivas en la primera extracción en relación a los ELISAI, probablemente relacionado con la presencia de IgM, lo que indicaría una mayor capacidad de este test para detectar animales positivos en etapas más tempranas de la enfermedad. Las muestras clasificadas como negativas de la segunda extracción pusieron de manifiesto una mayor similitud de comportamiento entre el ELISAc y la AMRB+FC que entre éstos y los ELISAI. Las muestras clasificadas como negativas por el ELISAc Svanova fueron clasificadas como positivas por el ELISAI Svanova y las muestras clasificadas como negativas por el ELISAI Svanova fueron clasificadas como positivas por el ELISAc Svanova, lo que pone de manifiesto la necesidad de utilizar test adicionales en la investigación de focos de brucelosis igual que se observó con los resultados obtenidos con las muestra del grupo A.

Para los sueros del grupo de positivos sin aislamiento (grupo C) el ELISAI Idexx clasificó como negativas el doble de muestras que los otros ELISAs, poniéndose nuevamente en evidencia su incapacidad para detectar muestras positivas en diferentes situaciones epidemiológicas.

Los resultados del ELISAc Svanova con las muestras clasificadas como negativas cuestionaron su uso como test de cribado en áreas de baja prevalencia. Así el grupo de sueros negativos de animales oficialmente indemnes (grupo D) la Sp de este test fue significativamente menor que la de los otros test tanto con el criterio absoluto como con el criterio relativo. Con estos datos su uso en la población de bovino de Galicia supondría unos 5.000 análisis adicionales al año en relación al uso de un ELISAI, siempre que estos análisis se realizasen por simple. En relación a los sueros con PA (grupo F) el ELISAc Svanova fue el único de los ELISAs que clasificó como positivo a alguno de estos sueros.

Se ha publicado la capacidad del ELISAc para diferenciar a los Ac procedentes de vacunas de los Ac procedentes de infecciones naturales de brucelosis (Nielsen y cols., 1995; Poester y cols., 1998). También se le ha atribuido la capacidad de diferenciar a los Ac procedentes de

microorganismos responsables de reacciones cruzadas de los Ac procedentes de infecciones naturales (Gall y cols., 1998; Nielsen y cols., 1995; Nielsen y cols., 2004; Nielsen, 2007; Pérez y Rojas, 1998; Sanmartino y cols., 1998; Weynants y cols., 1996). En este estudio, la revisión de los datos obtenidos para el grupo de sueros de animales con conversión (grupo B) apuntaban que el ELISAc Svanova fue capaz de detectar Ac de la infección por *Brucella* spp más temprano que los otros test. Estas tres situaciones epidemiológicas se asocian frecuentemente con las fases finales de la erradicación de la brucelosis y, por tanto, estaría perfectamente recomendado el uso del ELISAc en estas fases. Sin embargo, los resultados obtenidos en este estudio con el grupo de sueros negativos acompañantes de infectados (grupo E) y con el grupo de sueros falsos positivos (grupo G) cuestionaron alguno de los usos anteriores.

A nivel de campo se ha constatado que los animales infectados por microorganismos responsables de reacciones cruzadas respondieron de forma diferente en relación al tipo de Ac producido. En unos casos predominó la respuesta de Ac tipo IgM, en otros la respuesta de Ac tipo IgG y en otros aparecieron los dos Ac (Saegerman y cols., 2004). La respuesta responsable de las principales interferencias con los test serológicos para la brucelosis fue la relacionada con la producción de IgG. Sin embargo, a nivel de campo la más frecuente parece ser la respuesta relacionada con la producción de IgM (Saegerman y cols., 2004). En relación al ELISAi se observó que los sueros de campo procedentes de animales con presencia principal de IgM fueron negativos en más de un 70%, mientras que los sueros con presencia principal de IgG fueron positivos en más de un 85% (Saegerman y cols., 2004). En base a la cinética de aparición de las Ig, en la respuesta primaria de la brucelosis se producen inicialmente IgM (Pouillot y cols., 1998).

En este estudio, para el grupo de sueros falsos positivos (grupo G), se observó que el ELISAc Svanova fue el test que clasificó un mayor número de sueros como positivos y en un número muy superior a los otros ELISAs. Por tanto, la explicación a este comportamiento habría que buscarla en el hecho de que, en Galicia, el tipo de respuesta principalmente asociada a las reacciones cruzadas con los test serológicos para brucelosis sería de tipo IgM y, por tanto, el ELISAc Svanova nunca debería usarse como test de confirmación ante la sospecha de reaccionantes falsos positivos. Sin embargo, un resultado negativo de este test podría considerarse como definitivo. La presencia de IgM también explicaría la respuesta de la FC y de los ELISAi. Para estos últimos su comportamiento sería similar al descrito por Saegerman y cols. (2004). El ELISAi Idexx fue el test que menos sueros clasificó como positivos de todos los ELISAs, probablemente debido a la baja afinidad del test por determinados Ac presentes en el suero, al igual que se constató con otros grupos de muestras.

Para los sueros negativos acompañantes de infectados (grupo E) se obtuvieron datos “a posteriori”, de las bases de datos informáticas de sanidad animal, que clasificaron a estos animales como negativos en el momento de la toma de muestras de este estudio, excepto para cuatro de ellos en los que no se pudo verificar su situación real. Por tanto, los sueros tendrían que haber sido clasificados como negativos por los test. Sin embargo, el ELISAc Svanova nuevamente fue el que más sueros detectó como positivos de los tres ELISAs, seguido de la AMRB. La posición de estos sueros en los gráficos de distribución de frecuencias de los ELISAs mostró un patrón diferente al

resto de las muestras del supergrupo negativos distribuyéndose por la mitad central del rango de detección. Los animales de los que se obtuvieron las muestras procedían de explotaciones con casos positivos confirmados de brucelosis y la probabilidad de que estuviesen en contacto con el microorganismo fue muy elevada. Por tanto, se podría pensar que en el momento de la toma de muestras existiesen principalmente IgM y alguna IgG relacionadas con la respuesta primaria detectables por los ELISAs y la AMRB, pero no por la FC. En relación a la FC, ya se observó como en el grupo de sueros positivos de animales con aislamiento (grupo A) este test clasificó como negativas muestras positivas a la AMRB. Además, se ha podido comprobar que algún ELISAi fue capaz de detectar animales positivos en infecciones por *Brucella* spp más rápidamente que los test tradicionales (Saegerman y cols., 2004). Al igual que sucedió para otros grupos, el ELISAi Idexx fue el test que clasificó un menor número de animales como positivos y ya se indicó anteriormente la capacidad limitada de este test para detectar positivos. Todos los datos anteriores apuntan a que en estos sueros existirían Ac específicos frente a *Brucella* spp. que serían detectados por los test clasificando a los animales como positivos. No se puede saber de antemano si estos animales acabarían o no desarrollando la enfermedad, pero deberían de sacrificarse durante la realización de las CSG, constituyendo una parte de ellos los falsos positivos eliminados “innecesariamente” en el control de los focos de brucelosis.

Los gráficos de dispersión obtenidos para cada grupo de sueros pusieron de manifiesto un patrón de comportamiento estable para todos los test. Este patrón fue especialmente similar entre los ELISAi. De igual forma, el patrón del ELISAc Svanova fue mucho más parecido al de la FC que el de los ELISAi, lo que vino a corroborar que este ELISA tiene afinidad por una composición de Ig en los sueros similar al de la FC.

La Se, la Sp y la exactitud de un test se pueden ver afectados por el COff. Para la estimación del COff la herramienta más utilizada fueron las curvas ROC que los generan asociados a pares de Se/Sp eliminando la subjetividad de otros métodos (Gall y Nielsen, 2001). La modificación del COff permitirá que los test se adapten a aplicaciones específicas, aumento de la Se en las primeras etapas de la erradicación de la enfermedad o aumento de la Sp en las últimas etapas de la erradicación (Gall y Nielsen, 2001). Sin embargo, para el control de focos activos de brucelosis en áreas de baja prevalencia, el COff de los test debería ir en la dirección de incrementar la Se. En relación al resto de la población, no solo se debería estimar el COff más adecuado en función de la situación epidemiológica, si no que se debería evaluar también que combinaciones de test utilizadas para cribado y confirmación serían las más adecuadas (Mainar-Jaime y cols., 2005). La distribución de frecuencias fue muy útil para la comparación visual de la exactitud de los test con cada uno de los supergrupos de muestras, independientemente del COff. Para el ELISAi Idexx el descenso del COff mejoró su Se claramente sin afectar prácticamente a la Sp, pero ya se indicó que este test no debería usarse en una CSG sin las modificaciones necesarias. En relación a los otros dos ELISAs el descenso del COff también mejoró su Se. Esta variación prácticamente no afectó a la Sp del ELISAi Svanova, pero sí modificó a la del ELISAc Svanova afectando a todos los grupos de muestras del supergrupo de negativos. La modificación del COff para el ELISAc Svanova no produciría mejoras

evidentes sobre el grupo de sueros falsos positivos. Estos datos pusieron de manifiesto que el test más adecuado para utilizar de cribado fue el ELISAI Svanova con un ligero descenso del COff a 35. El descenso del COff del ELISAc Svanova a 25 también mejoró su comportamiento elevando la Se casi al 100%, por lo que se recomendaría su uso para la detección de animales positivos en focos activos de brucelosis, pero no se recomendaría su uso como test de cribado. En cualquier caso, las modificaciones del COff empeorarían el comportamiento de ambos test en el grupo de sueros falsos positivos.



## **VI. Conclusiones**

### ***Relacionadas con la verificación interna de los test***

1. La verificación interna de la aglutinación en microplaca con rosa de Bengala y de los ELISAs indirectos y de competición deberá incluir la estimación de la exactitud y de la precisión en condiciones de repetibilidad y de repetibilidad intermedia mediante el uso de estándares de referencia y/o de estándares internos ajustados a ellos.
2. El estándar de referencia positivo débil para un test de ELISA, suministrado a los laboratorios de diagnóstico de rutina, deberá presentar un valor normalizado esperado, como mínimo superior en un 10% al punto de corte, independientemente del ELISA utilizado. Además, si el estándar es común para diferentes tipos de ELISAs, todos ellos deben detectarlo a la misma dilución o a diluciones muy próximas. En el supuesto de que no se cumplan estos criterios deberían elaborarse estándares específicos para cada tipo de ELISA.
3. Los gráficos de control obtenidos al representar los valores de los estándares de las placas individuales y de los valores agrupados por días constituyen un modelo óptimo para evaluar la precisión en condiciones de repetibilidad intermedia para test de ELISA.

### ***Relacionadas con los parámetros de rendimiento absoluto***

4. La aglutinación en microplaca con rosa de Bengala es un test adecuado para su uso como prueba de cribado en el control de la brucelosis ya que su especificidad es claramente superior a la obtenida para la aglutinación en macroplaca con rosa de Bengala. Además, la sensibilidad y la especificidad son similares a las obtenidas para los test de ELISA indirecto y ELISA competición.
5. El uso de test similares para el diagnóstico no garantiza un comportamiento análogo entre ellos. Aunque para los ELISAs indirectos no se observaron diferencias significativas en la sensibilidad diagnóstica, los valores obtenidos fueron dispares.

**Relacionadas con las recomendaciones de uso en determinadas situaciones epidemiológicas**

6. La utilización de muestras representativas de diferentes situaciones epidemiológicas es fundamental para estimar los parámetros de rendimiento y establecer las recomendaciones de uso de los test de diagnóstico, y deberán incluirse en los estudios de extensión de la validación de un test.
7. Ninguno de los test estudiados es capaz de detectar todas las muestras procedentes de animales con aislamiento, por lo que se recomienda que los sueros procedentes de un foco activo de brucelosis sean analizados por diferentes test de forma que se detecte el mayor número posible de positivos.
8. Los valores de los parámetros de rendimiento absolutos y relativos, del índice *Kappa* y del área bajo curva de las curvas ROC obtenidos para el ELISA indirecto de Svanova indican que es el ELISA más adecuado para sustituir a la aglutinación en microplaca con rosa de Bengala como test de cribado.
9. La menor sensibilidad absoluta obtenida para el ELISA indirecto de Idexx, así como las diferencias significativas observadas para la sensibilidad relativa, en relación a los otros ELISAs desaconsejan el uso de este test en una campaña de saneamiento ganadero.
10. Dado que la modificación del punto de corte del ELISA competición de Svanova permite detectar prácticamente a todos los animales positivos, independientemente del grupo al que pertenezcan, y que la fijación de complemento disminuye la sensibilidad de la aglutinación en microplaca con rosa de Bengala cuando se usan en serie se recomienda la utilización de este tipo de ELISA para la confirmación de animales positivos en focos activos de brucelosis. Por otro lado, las diferencias significativas observadas en su especificidad, en relación a los otros test, como los datos obtenidos con los sueros falsos positivos desaconsejan su uso, tanto como test de cribado en sustitución de la aglutinación en microplaca con rosa de Bengala, como en la discriminación de reacciones cruzadas.

## **VII. Resumen**

En las fases finales de la erradicación de la brucelosis bovina, como es el caso de Galicia, se prioriza la detección temprana de los focos y la discriminación de las falsas reacciones negativas y positivas según que los animales procedan de focos activos de la enfermedad o de zona libres. Por tanto, el uso del test de diagnóstico más adecuado para cada situación epidemiológica puede suponer una reducción del período de erradicación junto con un descenso de los costes de los programas sanitarios.

Para que la elección de los test sea adecuada y se manifieste el potencial de cada uno de ellos en situaciones determinadas es imprescindible que los laboratorios de diagnóstico de rutina garanticen un comportamiento óptimo de cada uno de ellos en sus condiciones de trabajo. La herramienta más adecuada para este fin lo constituye la norma UNE-EN ISO/IEC 17025:2005.

En este estudio se evaluaron diferentes test utilizados habitualmente en el diagnóstico serológico de la brucelosis bovina: aglutinación en microplaca con rosa de bengala, aglutinación en microplaca con rosa de Bengala y fijación de complemento utilizados en serie, dos ELISAs indirectos, y un ELISA competición. Esta evaluación incluyó un protocolo de verificación interna según la norma UNE-EN ISO/IEC 17025:2005, una extensión de la validación aplicando un criterio de comparación absoluto, una extensión de la validación aplicando un criterio de comparación relativo y una evaluación del uso de los test de ELISA en diferentes situaciones epidemiológicas. En ambas extensiones de la validación se estimaron los parámetros de rendimiento más habituales de los test de diagnóstico como fueron la sensibilidad, la especificidad, los valores predictivos, las razones de verisimilitud, la eficiencia y el índice de rendimiento. En la extensión de la validación relativa se utilizó como test de comparación la aglutinación en microplaca con rosa de Bengala y la fijación de complemento aplicados en serie. Adicionalmente, se estimaron los índices *Kappa* correspondientes y las curvas ROC para los test de ELISA.

Para la extensión de la validación se utilizaron muestras obtenidas durante la realización de una campaña de saneamiento ganadero en Galicia y se organizaron en siete grupos que representan las diferentes situaciones epidemiológicas que se observaron en las fases finales de la erradicación de la enfermedad: sueros positivos de animales con aislamiento, sueros de animales con conversión del título de anticuerpos, sueros positivos de animales sin aislamiento, sueros negativos de animales oficialmente indemnes, sueros negativos acompañantes de infectados, sueros con PA y sueros falsos positivos.

En relación a la aglutinación en microplaca con rosa de Bengala y para los tres tipos de ELISA se elaboró un protocolo de verificación interna según los requisitos de la norma UNE-EN ISO/IEC 17025:2005. La verificación interna incluyó estudios de exactitud y de precisión, esta última en condiciones de repetibilidad y de repetibilidad intermedia, mediante el uso de estándares de referencia, de estándares internos ajustados a los primeros y de muestras de campo positivas y negativas. Adicionalmente, para los test de ELISA se elaboraron dos tipos de gráficos para el

seguimiento de la precisión en condiciones de repetibilidad intermedia. Estos gráficos incluyeron la representación de los valores de los estándares de cada placa (gráficos *DDD*) y de los valores de los controles de las placas agrupados por días (gráficos *SDC*).

En relación a los test, los valores absolutos y relativos obtenidos en la extensión de la validación pusieron de manifiesto la idoneidad de la aglutinación en microplaca con rosa de Bengala como test de cribado. En los focos activos de la brucelosis ninguno de los test fue capaz de detectar todos los animales positivos individualmente. También se observó que los test no clasificaban igual a todos los sueros. Por tanto, se recomienda el uso de los ELISAs indirecto y competición, en paralelo, en los focos activos de la infección. Para el ELISA competición se observaron limitaciones para su uso como test de confirmación debido a diferencias significativas de su especificidad. Este test, aunque no fue capaz de discriminar las reacciones cruzadas, fue el único capaz de detectar todos los animales positivos modificando el punto de corte, por lo que se recomienda su uso como test de confirmación en focos activos de la infección en substitución de la fijación de complemento. Uno de los ELISAs indirectos presentó diferencias significativas en la sensibilidad relativa en relación a los otros ELISAs y se desaconseja su uso en las campañas de saneamiento ganadero. Sin embargo, con los resultados obtenidos para el otro ELISA indirecto, se considera a este test como el más adecuado para una posible substitución de la aglutinación en microplaca con rosa de Bengala como test de cribado.

## **VIII. Summary**

In the latter stages of the eradication of bovine brucellosis, like occurs in Galicia, it is given priority to the early detection of the disease focus and the identification of false negatives and positives, taking into account if animals come from free areas or from areas where the infection is active. Therefore, the use of the most suitable diagnostic test for each epidemiological situation would mean a reduction in the period of eradication and in the cost of the sanitary programs.

In order to select the correct test and that each one would show the best potential in a fixed situation, it is necessary that routine diagnostic laboratories guarantee an optimum performance of each test in their working conditions. The most adequate tool to achieve this objective is the regulation UNE-EN ISO/IEC 17025:2005.

In this study were evaluated different test regularly used in the serological diagnosis of bovine brucellosis: the rose Bengal microplate agglutination test, the rose Bengal microplate agglutination test and the complement fixation test performed in series, two indirect ELISAs and finally, a competitive ELISA. This evaluation includes an internal verification protocol according to the regulation UNE-EN ISO/IEC 17025:2005, an extension of the validation to put into practice an absolute criterion of comparison, an extension of the validation to put into practice a relative criterion of comparison and a evaluation of the use of ELISAs test in different epidemiological situations. In both extensions of the validation, the performance parameters most used in diagnostic test were estimated like the sensitivity, the specificity, predictive values, likelihood ratios, the efficiency and the performance rate. In the extension of the relative validation was used as a comparison test the rose Bengal microplate agglutination test and the complement fixation test performed in a sequential way. In addition, it was estimated the corresponding *Kappa* rates and the ROC curves to ELISA test.

It was used samples obtained during the official sanitary program carried out in Galicia to the extension of the validation. They were organised in seven groups, which represents the different epidemiological situations that were observed in the later stages of the disease eradication: positive sera belong to animals with positive isolation, sera belong to animals with antibodies title conversion, positive sera belong to animals without isolation, negative sera belong to animals officially free, negative sera belong to animals companions of infected animals, sera with Anti-complement power and false positive sera.

An internal verification protocol according to the regulation UNE-EN ISO/IEC 17025:2005 was conducted in the case of the rose Bengal microplate agglutination test and to the three ELISAs. This internal verification included accuracy and precision studies. The later one was performance under conditions of repeatability and intermediate repeatability, using reference standards, internal standards fitted to the first and field positive and negative samples. Furthermore, in the case of ELISAs test was used two types of graphics to follow the test precision under intermediate repeatability conditions. This graphics represented also the standard value of each plate (graphics *DDD*) and the control value of the plates grouped by days (graphics *SDC*).

Taking into account the test used, the absolute and relative values obtained in the extension of the validation highlighted the suitability of the rose Bengal microplate agglutination test as a screening test. In active brucellosis focus none of the test were able of detect all positive animals individually. It was observed also that the tests did not classify all sera in the same way. Therefore, it is recommended the use of the indirect and competitive ELISAs in parallel in the active brucellosis focus. There were limitations in the use of competitive ELISA as a confirmation test due to significant differences in the specificity. However this test couldn't tell the difference between crossing reactions, it was the only that detected all positive animals if the threshold value was modifying, so it is recommended his use as confirmation test in active brucellosis focus to replace the complement fixation test. One of the indirect ELISAs showed significant differences in the relative sensitivity in relation with other ELISAs so his used is advised against in the sanitary programs analysis. Nevertheless, the results obtained with the other indirect ELISA showed that this test is the most adequate for one possible substitution of the rose Bengal microplate agglutination test as a screening test.

## **IX. Bibliografía**

Abdussalam, M., Fein, D.A., 1976. Brucellosis as a world problem. *Developments in Biological Standardization* 31, 9-23.

Alton, G.G., Jones, L.M., 1976. Las técnicas de laboratorio en la brucelosis. Serie de Monografías 55, 2ª edición. World Health Organization, Ginebra, Suiza.

Anderson, T.D., Cheville, N.F., 1986. Ultrastructural morphometric analysis of *Brucella abortus*-infected trophoblasts in experimental placentitis: bacterial replication occurs in rough endoplasmic reticulum. *The American Journal of Pathology* 124, 226-237.

Arenas, G., Staskevich, A.S., Aballay, A., Mayorga, L.S., 2000. Intracellular trafficking of *Brucella abortus* in J774 macrophages. *Infection and Immunity* 68, 4255–4263.

Bandara, A.B., Mahipala, M.B., 2002. Incidence of brucellosis in Sri Lanka: an overview. *Veterinary Microbiology* 90, 197-207.

Barberán, M., Blasco, J.M., 2002. Epidemiología, patogenía y cuadro clínico y lesional (Brucelosis ovina y caprina). *Ovis* 82, 39-53.

Bathke, W., 1981. Brucelosis. En: Beer, J., *Enfermedades infecciosas de los animales domésticos*. Ed. Acribia, Zaragoza, pp.142-165.

Blanco, J., Gonzalez, E.A., García, Blanco, M., Regueiro, B., Bernardez, I., 1988. Production of toxins by *Escherichia coli* strains isolated from calves with diarrhoea in Galicia (Noryh-western Spain). *Veterinary Microbiology* 18, 297-311.

Blasco, J.M., 1986. Estado actual de la brucelosis bovina en España. *Bovis* 9, 13-17.

Blasco, J.M., 1994. Estado actual de la brucelosis bovina en España. *Bovis* 57, 11-14.

Blasco, J.M., 2002a. Diagnóstico inmunológico. *Ovis* 82, 73-85.

Blasco, J.M., 2002b. Estrategias de control. Vacunas actuales y de nueva generación. En: *Brucelosis ovina y caprina*. *Ovis* 82, 87-101.

Blasco, J.M., Gamazo, C., 1994. Brucelosis animal. *Investigación y Ciencia* 219, 56-62.

- Bricker, B. J., 2002. PCR as a diagnostic tool for brucellosis. *Veterinary Microbiology* 90, 435-446.
- Cameron, H.S., Meyer, M.E., 1958. Metabolic studies on *Brucella neotomae* (Stoenner and Lackman). *Journal of Bacteriology* 76, 546-548.
- Centro Paramericano de Fiebre Aftosa, 2000. Brucelosis y tuberculosis (*M. bovis*). Situación de los programas en las Américas. Organización Panamericana de la salud (OPS/OMS). São Bento. Brasil.
- Cloeckaert, A., Verger, J.M., Grayon, M., Paquet, J.Y., Garin-Bastuji, B., Foster, G., Godfroid, J., 2001. Classification of *Brucella* spp. isolated from marine mammals by DNA polymorphism at the omp2 locus. *Microbes and Infection* 3, 729-738.
- Corbeil, L.B., Kent, B., Inzana, T.J., Nielsen, K., Jacobson, R.H., Corbeil, R.R., Winter, A.J., 1998. Killing of *Brucella abortus* by bovine serum. *Infection and immunity* 56, 3251-3261.
- Corbel, J.,M., 1972. Identification of the immunoglobulin class active in the rose bengala plate test for bovine brucellosis. *Journal of Hygiene* 70, 779-795.
- Corbel, M.J., 1997. Brucellosis: an overview. *Emerging Infectious Diseases* 3, 213-221.
- Corbel, M.J., Elberg, S.S., Cosivi, O., 2006. Brucellosis in humans and animals. Ed. World Health Organization Press, Geneva, Switzerland, pp.19-21.
- Crespo, F., Rodríguez, F., Cifuentes, D., Marsilla, B., 1986a. Contribución al estudio de la epizootiología de la brucelosis en cuatro regiones del norte de España. *Medicina Veterinaria* 3, 617-622.
- Crespo, F., Rodríguez, F., Marsilla, B., 1986b. Contribución al estudio de la epizootiología de la brucelosis en regiones del centro y sur de España. *Medicina Veterinaria* 3, 623-628.
- Crowther, J.R., 2009. Charting methods for internal quality control of indirect ELISA. In: *The ELISA Guidebook*, Volume 516. Ed. Humana Press, New Jersey, pp.381-429.
- Crowther, J.,R., Unger, H., Viljoen, G.J., 2006. Aspects of kit validation for test used for the diagnosis and surveillance of livestock diseases: producer and end-user responsibilities. *Review Scientific and Technical of the Office International des Epizooties* 25, 913-935.



Dájer-Abimerhi, A., Gutiérrez-Ruiz, E.J., Zapata-Villalobos, D., Honhold, N., Villegas-Pérez, S.L., 1995. Comparación de cinco pruebas serológicas para la detección de anticuerpos contra *Brucella abortus* y reporte preliminar del porcentaje de reactores positivos en hatos bovinos en Yucatán, México. Revista Biomédica 6, 84-90.

Deqiu, S., Donglou, X., Jiming, Y., 2002. Epidemiology and control of brucellosis in China. Veterinary Microbiology 90, 165-182.

Delgado, M., Llorca, J., 2002. Estudio de las pruebas diagnósticas. En: Medicina Preventiva y Salud Pública. Ed. Masson SA, Barcelona, pp.145-154.

Detilleux, P.G., Deyoe, B., Cheville, N.F., 1990. Penetration and intracellular growth of *Brucella abortus* in nonphagocytic cells in vitro. Infection and Immunity 58, 2320-2328.

Díaz, M., Castro, M.S., Lema, F., 1997. Campañas de Saneamiento Gandeiro 1993-1996. Ed. Servicio de Publicaciones Xunta de Galicia, Santiago de Compostela, pp.11-55.

Díaz, R., Blasco, J.M., 1994. Diagnóstico inmunológico de la brucelosis bovina. Bovis 57, 59-77.

Díaz, R., Jones, M.,L., Wilson, J., B., 1967. Antigenic Relationship of *Brucella ovis* and *Brucella melitensis*. Journal of bacteriology 93, 1262-1268.

Díaz, R., Jones, L.M., Wilson, J.B., 1968. Antigenic relationship of the gram-negative organism causing canine abortion to smooth and rough brucellae. Journal of Bacteriology 95, 618-624.

Dohoo, I.R., Wright, P.F., Ruckerbauer, G.M., Samagh, B.S., Robertson, F.J., Forbes, L.B., 1986. A comparison of five serological tests for bovine brucellosis. Canadian Journal of Veterinary Research 50, 485-493.

Doménech, J.M., 2004.- Teoría y cálculo de probabilidades. Pruebas diagnósticas. En: Fundamentos de diseño y estadística, Unidad 3. Ed. Signo, Barcelona, pp.41-67.

Epidat 3.1, 2005. Análisis epidemiológicos de datos tabulados. Pruebas diagnósticas. Xunta de Galicia y Organización Panamericana de la Salud.

Estein, S.M., 2006. Brucelosis: Inmunidad y vacunación (revisión bibliográfica). Revista electrónica de veterinaria 5, 1-25. Disponible en: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n050506.html> (Último acceso: 26/12/09).

European Communities, 2001. Brucelosis de los pequeños rumiantes (*Brucella melitensis*). Dirección General de Salud y Protección al Consumidor, SANCO.C.2/AH/R23/2001.

European Communities, 2002. Report on the Task Force Meeting of the “Bovine Brucellosis” and “Sheep & Goat Brucellosis” Sub-groups. Dirección General de Salud y Protección al Consumidor, SANCO/E.2/401/2002. Córdoba, Spain.

Ewalt, D.R., Payeur, J.B., Martin, B.M., Cummins, D.R., Miller, W.G., 1994. Characteristics of a *Brucella* species from a bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 6, 448-452.

Fensterbank, R., 1986. Brucellose des bovines et des petits ruminants: diagnostic, prophylaxie et vaccination. Review Scientific and Technical of the Office International des Epizooties 5, 587–603.

Fernández, M., Rojo, J., Aller, J.M., 1978. Aspectos epizootiológicos del aborto brucelar en el ganado ovino de la región del Duero. En: Recientes aportaciones veterinarias sobre brucelosis. Ed. Secretaria General Técnica del MAPA, Madrid, pp.59-62.

Ficht, T.A., 2003. Intracellular survival of *Brucella*: defining the link with persistence. Veterinary Microbiology 92, 213-223.

Flores, M., 1978. Disposiciones legales sobre brucelosis y estudio comparativo de las bases legales vigentes en España y en otros países. En: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Secretaría General Técnica (Eds.), Recientes aportaciones veterinarias sobre brucelosis. Publicaciones del MAPA, Madrid, pp.221-229.

Francia, C., Barcala, E., Puente, B., Fernández, D., Fernández, G., 2006. Validación del ELISAi para la detección de anticuerpos frente a infección de *Brucella abortus* en ganado vacuno. En: Veinte años de buiatría. Ed. Publicaciones de la Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, pp.401-407.

Francisco, J., Vargas, O., 2002. Brucellosis in Venezuela. Veterinary Microbiology 90, 39-44.

Gabinete de Servicios para la Calidad, 2009. Curso sobre Validación de métodos de diagnóstico asociados a laboratorios de sanidad animal. Septiembre 2009, Madrid.

Gall, D., Nielsen, K., 2001. Comparison of some methods for determining cutoff values for serological assays: a retrospective study using the fluorescence polarization assay. Journal of Immunoassay & Immunochemistry 22, 85–98.

Gall, D., Nielsen, K., 2004. Serological diagnosis of bovine brucellosis: a review of test performance and cost comparison. Review Scientific and Technical of the Office International des Epizooties 23, 989-1002.

Gall, D., Colling, A., Marino, O., Moreno, E., Nielsen, K., Perez, B., Samartino, L., 1998. Enzyme Immunoassays for serological diagnosis of bovine brucellosis: A trial in Latin America. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology 5, 654-661.

Godfroid, J., 2002. Brucellosis in wildlife. Review Scientific and Technical of the Office International des Epizooties 21, 277-286.

Godfroid, J., Käsböhrer, A. 2002. Brucellosis in the European Union and Norway at the turn of the twenty-first century. Veterinary Microbiology 90, 135-145.

Golding, B., Scott Dorothy, E., Scharf, O., Huang, L-Y., Zaitseva, M., Lapham, CH., Eller, N., Golding, H., 2001. Immunity and protection against *Brucella abortus*. Microbes and Infection 3, 43-48.

Greiner, A., Dorit, S., Göbel, P., 1995. A modified ROC analysis for the selection of cut-off values and the definition of intermediate results of serodiagnostic test. Journal of Immunological Methods 185, 123 -132.

Higgins, R., 2000. Bacteria and fungi of marine mammals: A review. Canadian Veterinary Journal 41, 105-116.

Hoffmann, E.M., Houle, J.J., 1995. Contradictory roles for antibody and complement in the interaction of *Brucella abortus* with its host. Critical Reviews in Microbiology 21, 153-163.

Hospital Ramón y Cajal, 2009. Material docente de la Unidad de Bioestadística Clínica.

Disponible en: [http://www.hrc.es/investigacion/inves\\_unidadbio.htm](http://www.hrc.es/investigacion/inves_unidadbio.htm) (Último acceso: 23-02-2010).

Jacobson, R.H., 1998. Validación de pruebas serológicas para el diagnóstico de enfermedades infecciosas. Review Scientific and Technical of the Office International des Epizooties 17, 507-526.

Jahans, K.L., Foster, G., Broughton, E.S., 1997. The characterisation of *Brucella* strains isolated from marine mammals. Veterinary Microbiology 57, 373-382.

Jones, R.D., Kelly, L., England, T., MacMillan, A., Wooldridge, M., 2004. A quantitative risk assessment for the importation of brucellosis-infected breeding cattle into Great Britain from selected European countries. *Preventive Veterinary Medicine* 63, 51–61.

Kerr, W.R., 1963. *Brucella* eradication in Northern Ireland. *Canadian Veterinary Journal* 4, 4-11.

Laboratorio Central de Veterinaria de Santa Fe, 2000. Curso de actualización en el diagnóstico de la Brucelosis. Diagnóstico bacteriológico. 1-14. MAPA. Granada.

Lamb, V., Jones, L.M., Schurig, G.G., Berman, D.T., 1979. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for bovine immunoglobulin subclass-specific response to *Brucella abortus* lipopolysaccharides. *Infection and Immunity* 26, 240-247.

Lapraik, R.D., 1982. Latent bovine brucellosis. *The Veterinary Record* 111, 578-579.

López-Merino, A., 2007. *Brucella*. En: Martínez Romero, E., Martínez Romero, J.C., (Eds), *Microbios en línea*. Publicaciones digitales. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México. Disponible en: <http://www.biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios/> (Último acceso: 25-06-09).

Luna-Martínez, J.E., Mejía-Terán, C., 2002. Brucellosis in Mexico: current status and trends. *Veterinary Microbiology* 90, 19-30.

Mainar-Jaime, R.C., Muñoz, P.M., De Miguel, M.J., Grilló, M.J., Marín, C.M., Moriyón, I., Blasco, J.M., 2005. Specificity dependence between serological tests for diagnosing bovine brucellosis in *Brucella* - free farms showing false positive serological reactions due to *Yersinia enterocolitica* O:9. *Canadian Veterinary Journal* 46, 913-916.

Marín, C.R., López-Goñi, I., Blasco, J.M., 2002. Etiología, diagnóstico bacteriológico y molecular. En: *Brucelosis ovina y caprina*, Ovis 82, 19-38.

McDermott, J.J., Arimi, S.M., 2002. Brucellosis in sub-Saharan Africa: epidemiology, control and impact. *Veterinary Microbiology* 90, 111-134.

McGiven, J.A., Tucker, J.D., Perrett, L.L., Stack, J.A., Brew, S.D., MacMillan, A.P., 2003. Validation of FPA and cELISA for the detection of antibodies to *Brucella abortus* in cattle sera and comparison to SAT, CFT, and iELISA. *Journal of Immunological Methods* 278, 171– 178.

McGiven, J.A., Stack, J.A., Perrett, L.L., Tucker, J.D., Brew, S.D., Stubberfield, E., MacMillan, A.P., 2006. Armonización de las pruebas europeas para el diagnóstico serológico de la brucelosis en bovinos. Review Scientific and Technical of the Office International des Epizooties 25, 1052-1053.

McGiven, J., Hendry, L., Brown, D., Stack, J., Perret, L., Mawhinney, I., 2008. The improved specificity of bovine brucellosis testing in Great Britain. Research in Veterinary Science 84, 38–40.

McMillan, A., 1990. Conventional serological test. In: Animal brucellosis. Ed. CRC Press, Florida, pp.153-198.

Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación (MAPA), 2006. Programa Nacional de Erradicación de Brucelosis bovina presentado por España para el año 2006. Disponible en: <http://rasve.mapa.es/Publica/Programas/Normativa.asp> (Último acceso 18-06-07)

Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación (MAPA), 2007a. Programa Nacional de Erradicación de Brucelosis bovina presentado por España para el año 2007. Disponible en: <http://rasve.mapa.es/Publica/Programas/Normativa.asp> (Último acceso: 18-16-07).

Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación (MAPA), 2007b. Programa Nacional de Erradicación de Brucelosis ovina y caprina presentado por España para el año 2007. Disponible en: <http://rasve.mapa.es/Publica/Programas/Normativa.asp> (Último acceso 18-06-07).

Ministerio de Medio Ambiente Rural y Marino (MARM), 2008. Programa Nacional de Erradicación de Brucelosis bovina presentado por España para los años 2009-2010. Presentado para cofinanciación 2009. Disponible en: <http://rasve.mapa.es//Publica/Programas/Normativa.asp> (Último acceso 07-01-10).

Ministerio de Medio Ambiente Rural y Marino (MARM), 2009. Programa Nacional de Erradicación de Brucelosis bovina presentado por España para cofinanciación 2010. Disponible en: <http://rasve.mapa.es//Publica/Programas/Normativa.asp> (Último acceso 08-01-10).

Moorhouse, P.D., Hugh-Jones, M.E., 1981. Serum banks. The Veterinary Bulletin 51, 277-290

Moreno, E., 2002. Brucellosis in Central America. Veterinary Microbiology 90, 31-38.

Moreno, E., Cloeckert, A., Moriyón, I., 2002. *Brucella*: evolution and taxonomy. Veterinary Microbiology 90, 209–227.

Moreno, E., Rojas, N., Nielsen, H., Gall, D., 1998. Comparison of different serological assays for the differential diagnosis of brucellosis. In: Colling, A. (Ed.). Diagnosis and epidemiology of animal diseases in Latin America. Viena: International Atomic Energy Agency, pp.153-162. (IAEA-TECDOC, 1055). Disponible en: <http://www-naweb.iaea.org/nafa/aph/public/moreno-competitive-1055.pdf> (Último acceso: 12-06-2010).

Moriyón, I., 1986. Estructura antigénica del género *Brucella*. Bovis 9, 39-53.

Moriyón, I., López-Goñi, I., 1994. Características estructurales y genéticas de *Brucella abortus*. Bovis 57, 39-57.

Moriyón, I., López-Goñi, I., 2002. Taxonomía, estructura antigénica y características genéticas de *Brucella mellitensis* y *Brucella ovis*. Ovis 82, 55-71.

Moriyón, I., Díaz, R., López-Goñi, I., 2001. Bacteriología del género *Brucella*. En: Manual de Brucelosis. Ed. Heraldo de Zamora, Zamora, pp.21-30.

Muñoz, P.M., Marín, C.M., Monreal, D., González, D., Garin-Bastuji, B., Díaz, R., Mainar-Jaime, R.C, Moriyón, I., Blasco, J.M., 2005. Efficacy of several serological tests and antigens for diagnosis of bovine brucellosis in the presence of false-positive serological results due to *Yersinia enterocolitica* O:9. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology 12, 141–151.

Nicoletti, P., 1994. Epidemiología, patogenia y cuadro clínico. Bovis 57, 17-25.

Nicoletti, P., 2002. A short history of brucellosis. Veterinary Microbiology 90, 5-9.

Nielsen, K., 2002. Diagnosis of brucellosis by serology. Veterinary Microbiology 90, 447-459.

Nielsen, K., Duncan, J.R., 1987. Bovine IgM: does it fix guinea pig complement in the absence of bovine complement components?. Veterinary Immunology and Immunopathology 14, 335-343.

Nielsen, K., Duncan, J.R., 1988. Further evidence that bovine IgM does not fix guinea pig complement. Veterinary Immunology and Immunopathology 19, 197-204.

Nielsen, K.H., Kelly, L., Gall, D., Nicoletti, P., Kelly, W., 1995. Improved competitive enzyme immunoassay for the diagnosis of bovine brucellosis. Veterinary Immunology and Immunopathology 46, 285-291.

Nielsen, K.H., Kelly, L., Gall, D., Balsevicius, S., Bosse, J., Nicoletti, P., Kelly, W., 1996. Comparison of enzyme immunoassays for the diagnosis of bovine brucellosis. *Preventive Veterinary Medicine* 26, 17-32.

Nielsen, K., Smith, P., Widdison, J., Gall, D., Kelly, L., Kelly, W., Nicoletti, P., 2004. Serological relationship between cattle exposed to *Brucella abortus*, *Yersinia enterocolitica* O:9 and *Escherichia coli* O157:H7. *Veterinary Microbiology* 100, 25–30.

Nielsen, K., Smith, P., Yu, W.L., Elmgren, C., Nicoletti, P., Perez, B., Bermudez, R., Renteria, T., 2007. Second generation competitive enzyme immunoassay for detection of bovine antibody to *Brucella abortus*. *Veterinary Microbiology* 124, 173–177.

Nielsen, K., Smith, P., Yu, W.L., Elmgren, C., Halbert, G., Nicoletti, P., Perez, B., Conde, S., Samartino, L., Nicola, A., Bermudez, R., Renteria, T., 2008. Validation of a second generation competitive enzyme immunoassay (CELISA) for the diagnosis of brucellosis in various species of domestic animals. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 125, 246–250.

Oficina Internacional de Epizootias (OIE), 1998. Directrices de la Oficina Internacional de Epizootias para la evaluación de la calidad de los laboratorios, los reactivos internacionales de referencia para las dosificaciones de anticuerpos y la evaluación de la capacidad de los laboratorios. Review Scientific and Technical of the Office International des Epizooties 17, 621-631.

Oficina Internacional de Epizootias (OIE), 2004. Brucelosis Bovina. En: Office International des Epizooties (Eds), Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestre (traducción en español de la 5ª edición del *Manual of Standards for Diagnostics Tests and Vaccines* (2004)). París, pp.445-476. Última actualización: 16-04-2008.

Disponible en: [http://www.oie.int/esp/normes/mmanual/e\\_summry.htm](http://www.oie.int/esp/normes/mmanual/e_summry.htm) (Último acceso: 06-01-2010)

Oficina Internacional de Epizootias (OIE), 2006a. Principios de validación para las pruebas de diagnóstico de enfermedades infecciosas (versión aprobada en mayo de 2006). Capítulo I.1.3, pp.21-31. Disponible en: [http://www.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf/es/1.1.03\\_Principios\\_de\\_validacion\\_2007.pdf](http://www.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf/es/1.1.03_Principios_de_validacion_2007.pdf) (Último acceso 21-02-2010)

Oficina Internacional de Epizootias (OIE), 2006b. Enfermedades de la Lista de la OIE (última actualización: 23-01-2006). Disponible en: [http://www.oie.int/esp/maladies/es\\_classification.htm](http://www.oie.int/esp/maladies/es_classification.htm) (Último acceso 19-12-2009)

Oficina Internacional de Epizootias (OIE), 2008. Norma de calidad y directrices de la OIE para los laboratorios veterinarios: enfermedades infecciosas. Ed. OIE, París, pp.29-38, 47-54.

Oficina Internacional de Epizootias (OIE), 2010. Base de datos del Sistema mundial de información zoonosanitaria (WAHID) – Versión: 1.4. Disponible en: <http://www.oie.int/wahis/public.php?page=home> (Último acceso: 08-02-2010).

Orduña, A., Bratos, M.A., Abad, R., Ruíz, L., De Frutos, M., Rodríguez, A., 2001a. La brucelosis. Etiología y origen de la infección humana. En: Manual de Brucelosis. Ed. Heraldo de Zamora, Zamora, pp.13-20.

Orduña, A., López, L., Miguel, M.A., Gutiérrez, P., Fernández, J.M., Rodríguez, A., 2001b. Patogenia de la brucelosis humana. En: Manual de Brucelosis. Ed. Heraldo de Zamora, Zamora, pp.99-112.

Ortiz, E.E., Silva, E., Izquierdo, M., 2007. Normalización y evaluación del inmunoensayo ABICAP-BRU para el diagnóstico serológico de la brucelosis bovina. REDVET Revista electrónica veterinaria 4, 57-89. Disponible en: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n040407/040712.pdf> (Último acceso: 16-11-2010).

Pappas, G., Akritidis, N., Bosilkovski, M., Tsianos, E., 2005. Brucellosis: review article. The New England Journal of Medicine 352, 2325-2336.

Pérez, B., Rojas, M., 1998. Field trial of brucellosis competitive ELISA. En: Diagnosis and epidemiology of animal diseases in Latin America, IAEA-TECDOC-1055. Ed. International Atomic Energy Agency, Vienna, pp.169-180.

Pizarro-Cerdá, J., Méresse, S., Parton, R.G., Van der Goot, G., Sola-Londa, A., López-Goñi, I., Moreno, E., Gorvel, J.P., 1998. *Brucella abortus* transits through the autophagic pathway and replicates in the endoplasmic reticulum of nonprofessional phagocytes. Infection and Immunity 66, 5711–5724.

Pizarro-Cerdá, J., Moreno, E., Gorvel, J.P., 2000. Invasion and intracellular trafficking of *Brucella abortus* in nonphagocytic cells. Microbes and Infection 2, 829–835.

Plommet, M., 1994. Control y profilaxis. En: Brucelosis, Bovis 57, 81-88.

Poester, F.P., Thiesen, S.V., 1994. Application of enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of bovine brucellosis in Rio Grande do Sul. Memorias del XIV Congreso Panamericano de ciencias veterinarias. Acapulco, pp.520-523.



Poester, F.P., Goncalves, V.S., Lage, A.P., 2002. Brucellosis in Brazil. *Veterinary Microbiology* 90, 55-62.

Portanti, O., Tittarelli, M., Di Febo, T., Luciani, M., Mercante, M. T., Conte, A., Lelli, R., 2006. Development and validation of a competitive ELISA kit for the serological diagnosis of ovine, caprine and bovine brucellosis. *Journal of Veterinary Medicine, Serie B*, 53, 494-498.

Pouillot, R., Garin-Bastuji, B., Dufour, B., 1998. Quelques clés pour le diagnostic de la brucellose bovine dans un contexte de réactions sérologiques faussement positives. *Le Point Veterinaire* 29, 728-732.

Rabenau, H.F., Kessler, H.H., Kortenbusch, M., Steinhorst, A., Raggamb, R.B., Berger, A., 2007. Verification and validation of diagnostic laboratory tests in clinical virology. *Journal of Clinical Virology* 40, 93-98.

Ragan, V.E., 2002. The Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS) brucellosis eradication program in the United States. *Veterinary Microbiology* 90, 11-18.

Refai, M., 2002. Incidence and control of brucellosis in the Near East region. *Veterinary Microbiology* 90, 81-110.

Renukaradhya, G.J., Isloor, S., Rajasekhar, M., 2002. Epidemiology, zoonotic aspects, vaccination and control/eradication of brucellosis in India. *Veterinary Microbiology* 90, 183-195.

Rius, J., 2007. Gráficos de control de Shewhart. Grupo de Quimiometría, Cualimetría y Nanosensores. Universitat Rovira i Virgili. Tarragona. *Técnicas de Laboratorio* 306, 1016-1019. Disponible en: <http://www.quimica.urv.es/quimio/cast/maincat.html> (Último acceso: 15-01-2010).

Rius, F.X., Maroto, A., Boqué, R., Riu, J., 2008. La validación de métodos analíticos. Departamento de Química Analítica y Química Orgánica. Instituto de Estudios Avanzados. Universitat Rovira y Virgili. <http://www.quimica.urv.es/quimio> (Último acceso: 15-01-2010).

Rivers, R., Andrews, E., González-Smith, A., Donoso, G., Oñate, A., 2006. *Brucella abortus*: inmunidad, vacunas y estrategias de prevención basadas en ácidos nucleicos. *Archivos de Medicina Veterinaria* 38, 7-18. Disponible en: [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0301-732X2006000100002&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301-732X2006000100002&lng=en&nrm=iso) (Último acceso: 23-07-2010).

Robles, C.A., 1998. Epididimitis contagiosa de los carneros por *Brucella ovis*. *Revista de Medicina Veterinaria* 79, 1-9.

Rodríguez, Y., Ramírez, W., Antúnez, G., Pérez, F., Ramírez, Y., Igarza, A., 2005. Brucelosis bovina, aspectos históricos y epidemiológicos. Revista Electrónica de Veterinaria 9. Disponible en: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n090905.html> (Último acceso: 16-06-2010).

Rojas, N., Freer, E., Weintraub, A., Ramirez, M., Lind, S., Moreno, E., 1994. Immunochemical identification of *Brucella abortus* lipopolysaccharide epitopes. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology 1, 206-213.

Rojas, N., Zamora, O., Cascante, J., Garita, D., Moreno, E., 2001. Comparison of the antibody response in adult cattle against different epitopes of *Brucella abortus* lipopolysaccharide. Journal of Veterinary Medicine, Series B 48, 623-629.

Rojas, X., Alonso, O., 1995. ELISAs for the diagnosis and epidemiology of *Brucella abortus* infection in cattle in Chile. Archivos de Medicina Veterinaria 27, 45-50.

Ross, H.M., Foster, G., Reid, R.J., Jahans, K.L., MacMillan, A.P., 1994. *Brucella* species infection in sea-mammals. The Veterinary Record 134, 359.

Ruisánchez, I., Trullols, E., Rius, F.X., 2003. Validación de métodos analíticos cualitativos. Técnicas de Laboratorio, 281. 328-335. Departamento de Química Analítica y Química Orgánica. Instituto de Estudios Avanzados. Universitat Rovira i Virgili. Tarragona.

Disponible en: <http://www.quimica.urv.es/quimio/cast/maincat.html> (Último acceso: 5-02-2010)

Saegerman, C., De Waele, L., Gilson, D., Godfroid, J., Thiange, P., Michel, P., Limbourg, B., Vo, T.K., Limet, J., Letesson, J.J., Berkvens, D., 2004. Evaluation of three serum i-ELISAs using monoclonal antibodies and protein G as peroxidase conjugate for the diagnosis of bovine brucellosis. Veterinary Microbiology 100, 91-105.

Saiz, L., 1978. Principales factores ecológicos y epidemiológicos condicionantes de la elevada prevalencia brucelósica en nuestro país. En: Recientes aportaciones veterinarias sobre brucelosis. Ed. Secretaria General Técnica del MAPA, Madrid, pp.113-131.

Sanmartino, L.E., 2002. Brucellosis in Argentina. Veterinary Microbiology 90, 71-80.

Sanmartino, L.E., Gregoret, R.J., Sigal, G., 1998. Field trial of a brucellosis competitive enzyme linked immunoabsorbent assay (ELISA). In: Diagnosis and epidemiology of animal diseases in Latin America. IAEA-TECDOC, 1055. Ed. International Atomic Energy Agency, Vienna, pp.163-167.

Samartino, L., Gall, D., Gregoret, R., Nielsen, K., 1999. Validation of enzyme-linked immunosorbent assays for the diagnosis of bovine brucellosis. *Veterinary Microbiology* 70, 193-200.

Sánchez-Vizcaíno, J.M., 2009. Curso de introducción a la inmunología porcina, 2ª edición. Disponible en: <http://www.sanidadanimal.info/cursos/inmuno2/index.htm> (Último acceso: 25-11-2010).

Splitter, G.A., 2007. The immune response to *Brucella*. En: Food and Agriculture Organization of The United Nations (Eds), *BruNet*.

Disponible en: [http://www.fao.org/ag/aga/agah/id/brunet\\_main/brunet/doc/bruwebsite.doc](http://www.fao.org/ag/aga/agah/id/brunet_main/brunet/doc/bruwebsite.doc) (Último acceso: 26-02-2008).

Sutherland, S.S., Searson, J., 1990. The immune response to *Brucella abortus*: the humoral response. En: *Animal Brucellosis*. Ed. CRC Pres, Florida, pp.66-75.

Sutra, L., Caffin, J.P., Dubray, G., 1986. Role of milk immunoglobulins in the *Brucella* milk ring test. *Veterinary Microbiology* 12, 359-366.

Taleski, V., Zerva, L., Kantardjiev, T., Cvetnic, Z., Erski-Biljic, M., Nikolovski, B., Bosnjakovski, J., Katalinic-Jankovic, V., Panteliadou, A., Stojkoski, S., Kirandziski, T., 2002. An overview of the epidemiology and epizootology of brucellosis in selected countries of Central and Southeast Europe. *Veterinary Microbiology* 90, 147-155.

Tizard, I. (Ed.), 2009. *Inmunología Veterinaria*. Ed. Elsevier España, Barcelona, pp.152-180.

UNE-EN ISO/IEC 17025:2005. Evaluación de la conformidad. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración.

Uzal, F.A., Carrasco, A.E., Nielsen, K., Echaide, S., Cabrerías, R.F., 1996. An indirect ELISA using a monoclonal anti IgG, enzyme conjugate for the diagnosis of bovine brucellosis. *Veterinary Microbiology* 52, 175-180.

Verger, J.M., 1994. Estudio y diagnóstico bacteriológico. *Bovis* 57, 27-36.

Weynants, V., Gilson, D., Cloeckert, A., Denoel, P.A., Tibor, A., Thiange, P., Limet, J.N., Letesson, J.J., 1996. Characterization of a monoclonal antibody specific for *brucella* smooth lipopolysaccharide and development of a competitive enzyme-Linked immunosorbent assay to improve the serological diagnosis of brucellosis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 3, 309-314.

Wright, P.F., 1998. Normas internacionales sobre métodos y sueros de referencia para pruebas de diagnóstico por detección de anticuerpos. Review Scientific and Technical of the Office International des Epizooties 17, 542-549.

Wright, P.F., Nilsson, E., Van Rooij, E.M. A., Lelenta, M., Jeggo, M.H., 1993- Standardisation and validation of enzyme-linked immunosorbent assay techniques for the detection of antibody in infectious disease diagnosis. In: Biotecnología aplicada al diagnóstico de las enfermedades animales. Review Scientific and Technical of the Office International des Epizooties 12, 435-450.

Wright, P.F., Tounkara, K., Lelenta, M., Jeggo, M.H., 1997. Internacional reference standards: antibody standards for the indirect enzyme-linked immunosorbent assay. Review Scientific and Technical of the Office International des Epizooties 16, 824-832.

Wyckoff, J.H., 2002. Bovine T lymphocyte responses to *Brucella abortus*. Veterinary Microbiology 90, 395-415.

## **X. Legislación**

European Communities, 2000. Decisión de la Comisión de 18 de abril de 2000 por la que se autorizan pruebas para la detección de anticuerpos de la brucelosis bovina en el ámbito de la Directiva 64/432/CEE del Consejo. DOCE L114, 13-05-2000, pp.37-38.

Ley 8/2003, de 24 de abril, de sanidad animal. BOE 99, 25-04-2003.

Orden ARM/831/2009, de 27 de marzo, por la que se modifican los anexos I y II del RD 617/2007, de 16 de mayo, por el que se establece la lista de las enfermedades de los animales de declaración obligatoria y se regula su notificación. Boletín Oficial del Estado 82, 04-04-2009.

Orden ARM/2166/2009, de 29 de julio, por la que se modifica el anexo 2 del Real Decreto 2611/1996, de 20 de diciembre, por el que se regulan los programas nacionales de erradicación de enfermedades de los animales. Boletín Oficial del Estado 191, 08-08-2009.

Real Decreto 2611/1996, de 20 de diciembre, por el que se regulan los programas nacionales de erradicación de enfermedades de los animales. Boletín Oficial del Estado 307, 21-12-1996.

Real Decreto 1716/2000, de 13 de octubre, sobre normas sanitarias para el intercambio intracomunitario de animales de las especies bovina y porcina. Boletín Oficial del Estado 256, 25-10-2000.

Real Decreto 1047/2003, de 1 de agosto, por el que se modifica el RD 2611/1996 de 20 de diciembre, por el que se regulan los programas nacionales de erradicación de enfermedades de los animales. Boletín Oficial del Estado 216, 09-09-2003.

Real Decreto 617/2007, de 16 de mayo, por el que se establece la lista de enfermedades de los animales de declaración obligatoria y se regula su modificación. Boletín Oficial del Estado 118, 17-05-2007.